

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
COURBEVOIE  
—

①① N° de publication :

**2 994 697**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

**12 57980**

⑤① Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 7/01** (2016.01), C 12 N 15/63, 15/45, A 61 K  
39/155, A 61 P 31/14, G 01 N 33/569

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤④ SOUCHE VACCINALE MARQUEE DU VIRUS DE LA PESTE DES PETITS RUMINANTS, ET  
SON PROCEDE D'OBTENTION.

②② Date de dépôt : 24.08.12.

③③ Priorité :

⑥⑥ Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *CENTRE DE COOPERATION  
INTERNATIONALE EN RECHERCHE  
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT  
(CIRAD) Etablissement public — FR.*

④③ Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 28.02.14 Bulletin 14/09.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 13.05.16 Bulletin 16/19.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑦② Inventeur(s) : LIBEAU GENEVIEVE, MINET  
CECILE, GIL PATRICIA, ALBINA EMMANUEL et  
KWIATEK OLIVIER.

⑦③ Titulaire(s) : CENTRE DE COOPERATION  
INTERNATIONALE EN RECHERCHE  
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT  
(CIRAD) Etablissement public.

⑦④ Mandataire(s) : GEVERS & ORES Société  
anonyme.

FR 2 994 697 - B1



**SOUCHE VACCINALE MARQUÉE DU VIRUS DE LA PESTE DES PETITS  
RUMINANTS, ET SON PROCÉDÉ D'OBTENTION**

La présente invention concerne une souche vaccinale marquée du virus de la peste des petits ruminants.

La peste des petits ruminants (PPR) est une  
5 maladie animale infectieuse et contagieuse. Avec des taux de morbidité et de mortalité pouvant atteindre respectivement 80% et 90-100%, cette maladie a un impact économique important dans les pays où elle sévit. Elle affecte le plus souvent les petits ruminants domestiques,  
10 tels que chèvres et moutons, et plus rarement la faune sauvage. Décrite pour la première fois en 1942 en Côte d'Ivoire, la PPR peut être confondue avec d'autres maladies de symptomatologie similaire, notamment la peste bovine. Contrairement à cette dernière, la PPR n'a pas bénéficié de  
15 programme international de surveillance et de contrôle, et continue par conséquent de progresser en menaçant de s'étendre à d'autres zones que celles classiquement touchées par la maladie.

La peste des petits ruminants est due à un  
20 virus du genre *Morbillivirus* de la famille des *Paramyxoviridae*. Les *Morbillivirus* sont impliqués dans différentes maladies, affectant divers hôtes : le virus de la rougeole (MV pour *measles virus*) chez l'homme, le virus responsable de la maladie de Carré (CDV pour *canine distemper virus*) chez les canidés, le virus de la peste bovine (RPV pour *rinderpest virus*) affectant les bovins et les buffles, le virus de la peste des petits ruminants (PPRV), et les morbillivirus affectant les mammifères marins, les phoques avec le PDV (pour *phocine distemper virus*) et les cétacés avec le CMV (pour *cetacean morbillivirus*), qui regroupe le DMV (pour *dolphin morbillivirus*), morbillivirus de dauphin, et le PMV (pour *porpoise morbillivirus*), morbillivirus de marsouins.  
30

Les morbillivirus sont des virus enveloppés, pléomorphes, dont la taille varie de 150 à 700 nm. Ils ont un génome d'environ 16 kilobases, constitué d'un ARN négatif simple brin codant pour six protéines structurales : la nucléoprotéine (N), la phosphoprotéine (P), la protéine de matrice (M), la protéine de fusion (F), l'hémagglutinine (H) et l'ARN polymérase ARN-dépendante (L). La nucléoprotéine est la protéine majoritaire de la ribonucléoprotéine (RNP), qui constitue la structure minimale essentielle pour la transcription et la réplication du génome viral dans le cytoplasme cellulaire.

Le vaccin actuellement utilisé contre la peste des petits ruminants a été développé en 1989, par atténuation de la souche virulente Nigéria 75/1 par passages successifs en culture cellulaire (Diallo et al., *Rev Elev Med Vet Pays Trop*, 42(3) :311-319, 1989). Ce vaccin actuel offre une bonne protection aux animaux durant toute leur vie économique, soit environ trois ans, et a montré, après des années d'utilisation massive, toute son innocuité. La séquence de ce vaccin est disponible dans GenBank sous le numéro d'accès X74443. L'inconvénient lié à l'utilisation du vaccin anti-PPRV actuel est qu'il n'est pas possible de faire de distinction sérologique entre les animaux vaccinés et les animaux infectés naturellement, ce qui rend plus longue et plus coûteuse la surveillance de la maladie. Faire cette distinction serait une amélioration importante pour permettre un programme de vaccination efficace en temps et en coût, en particulier en réalisant une vaccination éclairée et ciblée, et en ne bloquant pas inutilement la circulation des animaux, notamment dans le cadre d'échanges commerciaux des ovins et caprins. Il existe donc aujourd'hui un besoin de développer un vaccin qui permettrait, associé à un test de diagnostic adapté, de faire cette distinction entre animaux vaccinés et animaux infectés.

Les vaccins DIVA (pour "differentiation of infected and vaccinated animals") permettent de distinguer

sérologiquement un animal vacciné d'un animal infecté. De tels vaccins peuvent être notamment des vaccins recombinants, le génome viral étant par exemple marqué par délétion, par substitution ou par insertion de séquence  
5 nucléotidique, ou des vaccins hétérologues dérivés du génome viral d'un autre virus proche phylogénétiquement du virus à traiter, tel que le morbillivirus de la peste bovine dans le cas d'un vaccin contre la PPR. A titre d'exemple, un virus chimère peste bovine-peste des petits  
10 ruminants, dans lequel les gènes M, F et H du virus de la peste bovine ont été substitués par ceux du PPRV, a montré son efficacité comme vaccin dans la protection de chèvres contre le PPRV (Mahapatra et al., *J. Gen. Virol.*, 87 :2021-9, 2006).

15 Les symptômes de la PPR pouvant facilement être confondus avec ceux de la peste bovine, il est important de faire un diagnostic sérologique de la maladie. La méthode immuno-enzymatique en ELISA par compétition (C-ELISA) est en général utilisée. Le principe de la technique est de  
20 détecter la présence du virus dans le sérum extrait d'un animal malade à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique d'une des protéines constituant la particule virale. Par exemple, un kit ELISA est actuellement commercialisé pour la mise en œuvre d'un test basé sur une compétition des  
25 anticorps sériques avec l'anticorps monoclonal 38-4 reconnaissant un motif situé dans la région N-terminale, entre les acides aminés 116 et 150, de la nucléoprotéine virale (Libeau et al., *Res Vet Sci*, 58(1) : 50-55, 1995). Ce test réalisé sur le sérum d'animaux vaccinés avec le  
30 vaccin anti-PPRV constitué de la souche Nigéria 75/1 atténuée donne un résultat similaire à ce même test réalisé sur le sérum d'animaux infectés naturellement par le PPRV. D'autres anticorps monoclonaux dirigés contre des antigènes du PPRV ont été obtenus, notamment dirigés contre la  
35 protéine H (Anderson et al., *Epidemiol. Infect.*, 112 :225-31, 1994), ou contre la protéine N (Libeau et al., *Vet. Microbiol.*, 31 :147-60, 1992). Pour permettre la

distinction entre animaux vaccinés et animaux infectés par le virus sauvage, il faut en plus d'un vaccin DIVA disposer d'un test de diagnostic adapté, en particulier des anticorps monoclonaux adaptés pour la détection des  
5 antigènes par C-ELISA.

Il serait avantageux de disposer d'un vaccin anti-PPRV marqué basé sur un virus recombinant de la peste des petits ruminants. Cependant, pour obtenir un tel virus recombinant, il est nécessaire de disposer d'un clone  
10 infectieux du virus de la PPR (PPRV).

Dans ce contexte, les Inventeurs ont cherché à obtenir un clone infectieux du PPRV, pour ensuite y intégrer un marquage. Des clones infectieux manipulés par génétique inverse ont déjà été produits pour certains  
15 morbillivirus, tel que le virus de la rougeole (Schneider et al., *J. Virol. Methods*, 64(1) :57-64, 1997 ; Radecke et al., *Embo. J.*, 14(23) :5773-84, 1995 ; Parks et al., *J. Virol.*, 73(5) :3560-6, 1999 ; Takeda et al., *J. Virol.*, 74(14):6643, 2000 ; Witko et al., *J. Virol. Methods*,  
20 135(1) :91-101, 2006), de la maladie de Carré (Gassen et al., *J. Virol.*, 74(22) :10737-44, 2000 ; Witko et al., 2006, précité) et de la peste bovine (Baron et al., *J. Virol.*, 71(2) :1265-71, 1997 ; Das et al., *J. Virol.*, 74(19) :9039-47, 2000). Pour des raisons encore non  
25 établies mais supposées être liées à la séquence de son génome, la génération d'un clone infectieux du virus de la PPR n'avait pas abouti jusqu'à récemment, malgré l'investissement de plusieurs équipes de recherche au niveau international.

30 Hu et al. (*Vet. Res.*, 43 :48, 2012) ont récemment décrit l'obtention d'un clone du virus de la PPR. Après avoir obtenu un clone d'ADNc (GenBank n° HQ197753) correspondant au génome complet de la souche vaccinale Nigéria 75/1, placé sous contrôle du promoteur du  
35 cytomégalovirus (pCMV), ils y ont inséré une cassette d'expression de la GFP (*Green fluorescent protein*). Puis, ils ont co-transfecté des cellules Vero (ATCC CCL-81) avec

le plasmide obtenu ainsi qu'avec des plasmides exprimant les protéines N, P et L du virus. Des cellules Vero modifiées, exprimant la forme canine du récepteur à morbillivirus, la molécule SLAM (pour *signalling lymphocyte activation molecule*), ont également été utilisées pour la transfection.

Les Inventeurs ont réussi, par un procédé différent de celui décrit par Hu et al., à obtenir un clone infectieux du virus de la PPR.

La présente invention a donc pour objet un procédé d'obtention d'un clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants, comprenant des étapes de :

a) obtention d'un plasmide de clonage incluant l'ADNc du génome complet du virus, sous contrôle du promoteur de la polymérase T7 ;

b) transfection de cellules CV-1 ou Vero, transformées pour exprimer le récepteur SLAM de la chèvre, et exprimant la polymérase T7, avec le plasmide de clonage et avec des plasmides incluant respectivement l'ADNc des gènes N, P et L du virus ;

c) mise en culture des cellules transfectées et amplification du clone infectieux.

Les cellules de la lignée cellulaire CV-1 (ATCC, CCL-70) sont des fibroblastes de rein de singe vert. Adombi et al. (*J. Virol. Methods*, 173 : 306-313, 2011) ont décrit l'obtention de cellules, appelées CHS-20, correspondant à des cellules CV-1 modifiées pour exprimer la protéine SLAM de la chèvre (GenBank, DQ228869).

Les cellules de la lignée Vero (ATCC, CCL-81) sont des cellules épithéliales de rein de singe vert et peuvent être modifiées pour exprimer la protéine SLAM de la chèvre selon des techniques connues de l'homme du métier.

La polymérase T7 est l'ARN polymérase du bactériophage T7. Les cellules CV-1 ou Vero n'exprimant pas naturellement la polymérase T7, il est nécessaire d'apporter des moyens d'expression de cette enzyme dans la cellule. Les méthodes pour faire exprimer la polymérase T7

dans une cellule de mammifère sont connues de l'homme du métier. Notamment, les cellules sont préalablement infectées de préférence à l'aide d'un virus recombinant non répliquatif de la variole aviaire, appelé Fowlpox, exprimant  
5 la polymérase T7 (FP-T7), ou transfectées avec un plasmide exprimant l'ARN polymérase T7, par exemple sous promoteur du cytomégalo virus (plasmide pCMV-T7).

En particulier, un plasmide de clonage incluant l'ADNc du génome complet du virus de la PPR est obtenu par  
10 l'isolement de l'ARN génomique viral à partir de cellules infectées par le virus, l'amplification dudit ARN en plusieurs fragments, et l'assemblage desdits fragments dans le plasmide de clonage pour reconstituer l'ADNc du génome complet, sous contrôle du promoteur de la polymérase T7. Le  
15 plasmide de clonage peut être choisi ou préparé, par des techniques connues en elles-mêmes, de façon à inclure un site multiple de clonage regroupant les sites de restriction enzymatique permettant l'insertion des différents fragments. En particulier, des plasmides de  
20 clonage commerciaux peuvent être utilisés en en modifiant si nécessaire le site multiple de clonage.

Par exemple, le génome viral est celui du virus de la peste des petits ruminants de la souche vaccinale Nigéria 75/1, obtenue par atténuation de la souche  
25 virulente nigériane du PPRV, Nigéria 75/1, par passages en série sur cellules Vero. Le génome complet de cette souche vaccinale a été séquencé (GenBank, X74443).

L'invention a également pour objet un clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants, tel  
30 qu'il peut être obtenu par le procédé selon l'invention tel qu'il vient d'être défini.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de l'invention, pour obtenir un virus marqué, l'étape a) comprend en outre le marquage de l'ADNc du  
35 génome complet. Ce marquage peut être réalisé de différentes manières, selon des méthodes connues de manipulation de l'ADN, et notamment par insertion d'une

séquence hétérologue dans cet ADNc, par délétion d'un fragment de cet ADNc, ou par substitution d'un fragment de cet ADNc codant pour un épitope endogène dudit virus par un fragment codant pour un épitope exogène (c'est-à-dire  
5 n'étant pas présent dans le virus de la peste des petits ruminants), les deux épitopes étant reconnus par des paratopes différents.

L'épitope endogène est choisi notamment pour son immunogénicité qui doit être suffisante pour permettre  
10 une bonne détection du virus de la PPR dans les sérums d'animaux qui auraient été infectés naturellement.

L'épitope endogène et l'épitope exogène doivent être choisis de manière à ce que la substitution n'altère pas la fonction de la protéine concernée. En particulier,  
15 leurs tailles respectives, qui peuvent être identiques ou différentes, pourront par exemple être comprises entre 2 et 30 acides aminés, avantageusement entre 3 et 20 acides aminés, et plus particulièrement entre 4 et 15 acides aminés. De préférence, leur taille sera la même à 1, 2 ou 3  
20 acides aminés près.

Des peptides utilisables en tant qu'épitope exogène sont par exemple des peptides appelés « Tag », sont des fragments de protéines naturelles ou des peptides synthétiques, qui sont commercialisés en tant que marqueurs  
25 pour leur utilisation en biologie moléculaire. Parmi les peptides Tag disponibles, on choisit de préférence celui ou ceux qui sont les plus couramment utilisés et pour lesquels il existe des réactifs de diagnostic en C-ELISA ou un anticorps monoclonal commercial. Ensuite, pour confirmer  
30 qu'un Tag peut être utilisé comme marqueur dans le vaccin anti-PPRV, il faut s'assurer d'une part que des anticorps dirigés contre l'épitope sélectionné sont bien produits par l'animal cible, d'autre part que les sérums d'animaux cibles, infectés ou non par le PPRV, n'interagissent pas  
35 naturellement avec le Tag.

A titre d'alternative à ces peptides Tag, on peut remplacer une partie d'un gène dans le génome du virus



de la PPR par une séquence homologue présente chez un autre morbillivirus. Une telle séquence homologue est choisie par les moyens habituels de la génétique. Par exemple, après alignement des séquences protéiques des différents morbillivirus (RPV, MV, CDV, PDV, CMV) dans la zone du génome concernée, les séquences se rapprochant le plus de celle de PPRV 75/1 sont choisies. Un peptide chimère peut aussi être synthétisé, en y reprenant par exemple les acides aminés les plus fréquemment retrouvés à chacune des positions dans les différents morbillivirus.

Les Inventeurs ont en particulier identifié une région dans la partie C-terminale de la protéine N, spécifique du virus de la PPR, ainsi que des séquences-marqueurs permettant de maintenir l'expression et la fonctionnalité de la protéine N. L'épitope identifié au sein de la protéine N a été nommé peptide E et est codé par les nucléotides 1557 à 1592 de l'ADNc du génome viral. Il a pour séquence  $X_1X_2$ REAQRS AEAL (SEQ ID NO : 1), dans laquelle  $X_1$  représente T ou N, et  $X_2$  représente S ou P. A titre d'exemple, la séquence de cette région de la protéine N chez la souche vaccinale Nigéria 75/1 (GenBank, X74443) est NPREAQRS AEAL (SEQ ID NO :14 ). Pour la même région, les séquences TSREAQRS AEAL (SEQ ID NO:15) ou TPREAQRS AEAL (SEQ ID NO:16) ont été trouvées dans d'autres souches du virus de la PPR.

Selon une version avantageuse de l'invention, l'épitope exogène est choisi parmi le peptide EQKLISEEDL SEQ ID NO. : 2 dérivé de la protéine c-myc, le peptide EDQVDPRLIDGK SEQ ID NO. : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide DPISIQKSAEAL SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin, ledit peptide étant homologue au peptide E du virus de la PPR.

De préférence, il s'agit du peptide SEQ ID NO. : 4.

Le choix de modifier le gène N est particulièrement avantageux du fait que les anticorps anti-N sont les premiers synthétisés et sont majoritaires

lors de la réponse immunitaire produite par des animaux infectés ou vaccinés par le virus de la PPR.

L'invention a aussi pour objet un virus recombinant marqué de la peste des petits ruminants, susceptible d'être obtenu par ce mode de réalisation particulier du procédé de l'invention. Par exemple, ledit virus comprend la souche vaccinale Nigéria 75/1, dans laquelle les acides aminés 484 à 495 de la nucléoprotéine N (GenBank CAA52454.1), correspondant au peptide E, sont  
5 remplacés par un épitope marqueur choisi parmi le peptide SEQ ID NO : 2 dérivé de la protéine c-myc, le peptide SEQ ID NO : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide SEQ ID NO : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin.  
10

Un autre objet de l'invention est un procédé de marquage d'un clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants, comprenant la substitution d'un fragment de l'ADNc dudit virus codant pour un épitope endogène de séquence SEQ ID NO: 1, par un fragment codant pour un épitope exogène choisi parmi le peptide SEQ ID NO. : 2  
15 dérivé de la protéine c-myc, le peptide SEQ ID NO. : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin.  
20

L'invention concerne également une molécule d'ADNc codant pour le virus recombinant marqué de la peste des petits ruminants tel qu'il vient d'être défini.  
25

Un autre objet de l'invention est tout plasmide contenant une molécule d'ADNc codant pour le virus recombinant marqué de la peste des petits ruminants.

Un objet de l'invention est également une cellule-hôte transformée avec un plasmide contenant une molécule d'ADNc codant pour le virus recombinant marqué de la peste des petits ruminants.  
30

L'invention a encore pour objet le virus recombinant marqué de la PPR selon l'invention pour son utilisation comme vaccin prophylactique ou thérapeutique contre la peste des petits ruminants.  
35

Un autre objet de l'invention est un vaccin marqué contre la peste des petits ruminants, ou une composition immunogène, comprenant le virus recombinant marqué selon l'invention. Un tel vaccin constitue un vaccin  
5 DIVA, permettant la distinction entre animaux vaccinés et animaux infectés naturellement.

L'invention concerne aussi un kit de diagnostic sérologique de la peste des petits ruminants, ce kit contenant des anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement  
10 contre un épitope dans la partie C-terminale de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants, ayant pour séquence SEQ ID NO. 1, et des anticorps monoclonaux anti-marqueur dirigés spécifiquement contre un épitope marqueur tel que le peptide SEQ ID NO. : 2 dérivé de la protéine c-  
15 myc, le peptide SEQ ID NO. : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide homologue SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin. Les anticorps monoclonaux qui ne sont pas déjà disponibles peuvent être obtenus par des méthodes classiques de biologie. Un tel kit pourra être  
20 utilisé en C-ELISA.

Le vaccin DIVA selon l'invention pourra être utilisé en particulier dans une campagne d'éradication de la PPR et permet d'envisager, en association avec un diagnostic en C-ELISA à l'aide d'un kit selon l'invention,  
25 de faire la distinction entre les animaux infectés naturellement par le virus et les animaux vaccinés dans le cadre de cette campagne.

**EXEMPLE 1 : ASSEMBLAGE DU GENOME COMPLET DU VIRUS DE LA PPR DE LA SOUCHE VACCINALE NIGERIA 75/1.**

30 La souche vaccinale Nigeria 75/1 est issue de la souche virulente Nigeria 75/1 atténuée par passages successifs sur cellules (Diallo et al., 1989, précité). Le génome complet du virus de la souche vaccinale Nigeria 75/1 est accessible dans GenBank sous le numéro X74443.

35 Ce génome complet était disponible sous la forme de 4 fragments chevauchants d'ADNc (Figure 1) obtenus

à partir d'un extrait d'ARN viral. Le point de départ de l'assemblage a donc été les 4 clones suivants contenant chacun un des 4 fragments d'ADNc :

- 5       - le clone 1 (pT7hhLNP), contenant le promoteur de la polymérase T7 (pT7), la séquence du ribozyme en tête de marteau (*Hammerhead ribozyme*, HamRz), la région 3'-extracistronique (le « leader »), le gène N en entier, la séquence intergénique N-P et le début du gène P ;
- 10      - le clone 2 (pPMintpCRII), contenant les gènes P et M en entier, un morceau des séquences intergéniques N-P et M-F, et la séquence entre les gènes P et M ;
- 15      - le clone 3 (17MLmut), contenant une partie de la séquence intergénique M-F, le gène F en entier, la séquence intergénique F-H, le gène H en entier, la séquence intergénique H-L, et le début du gène L ; et
- 20      - le clone 4 (pL-BKS-IREST7), contenant la fin de la séquence H, la partie intergénique H-L, le gène L en entier et la région 5'-extracistronique (le « trailer »), ainsi que la séquence interne d'entrée du ribosome (IRES, de l'anglais « *internal ribosome entry site* »), le ribozyme delta du virus de l'hépatite C et le terminateur de la polymérase T7 (riboT7ter).

25       Ces clones incluent en outre chacun des sites uniques de restriction permettant leur assemblage dans le plasmide de clonage pBKSmofMCS qui a été obtenu en remplaçant le site multiple de clonage (MCS) du plasmide pBluescriptKSII (Stratagène, France) par un MCS regroupant les sites de restriction adaptés à la stratégie de clonage

30       (Bss HII (620), Bgl I (633), Rsr II (639), Age I (645), Sac II (655), Swa I (661)).

35       Les quatre fragments du génome entier du virus de la souche vaccinale Nigeria 75/1 ont alors pu être assemblés selon la stratégie schématisée aux Figures 2 et 3. Le clone 17MLmut a été inséré dans le plasmide pBKSmofMCS pour obtenir le plasmide passemblage1. Le clone 3, contenant le promoteur de la polymérase T7, est

ensuite inséré dans `passemblage1` pour générer le plasmide intermédiaire `passemblage2` (Figure 2). Le plasmide `pPMintpCRII` est inséré dans `passemblage2` pour obtenir `passemblage3` dans lequel on clone `pL-BKS-IREST7` pour  
5 générer le plasmide final `passemblage4term` compatible avec le système de reconstitution utilisé dans l'Exemple 2, qui contient le génome viral complet de PPRV 75/1, encadré en 3' par le promoteur `pT7` et le `HamRz`, et en 5' par le ribozyme delta et le terminateur `T7ter` (Figure 3).

10 Le clone obtenu a été séquencé en totalité et a pour séquence la SEQ ID NO. : 5. Vingt-huit différences de séquence ont été notées par rapport au virus parental (souche vaccinale PPRV Nigéria 75/1). Huit de ces erreurs (Figure 4) modifient les codons : deux sur le gène H, aux  
15 positions 7961 et 8829, et six sur le gène L, aux positions 9585, 11551, 13212, 13924, 13939 et 14543. Ces différences de séquence n'ont pas été un obstacle à l'obtention d'un clone infectieux du virus de la PPR.

20 **EXEMPLE 2 : OBTENTION D'UN CLONE INFECTIEUX DU VIRUS VACCINAL PPRV 75/1.**

La manipulation du virus de la PPR, en tant que virus à ARN négatif, a nécessité la mise au point d'un système de reconstitution (ou « *rescue* »), similaire à celui décrit par Bailey et al. (*Virus Res.*, 126(1-2) :250-  
25 255, 2007), et testé et validé à l'aide d'un minigénome exprimant la protéine fluorescente eGFP (pour « *enhanced green fluorescent protein* ») (Minet et al, *Virus Research*, 145:9-17, 2009).

Le système consiste à produire, dans le  
30 cytoplasme de cellules hôtes, à partir d'ADN plasmidiques, l'ARN correspondant au génome viral et les ARNm des protéines N, P et L. Ces 3 protéines sont alors synthétisées par la cellule et s'auto-assemblent avec l'ARN génomique viral pour former la ribonucléoprotéine (RNP) qui  
35 va générer un virus infectieux. Le principe du système de

reconstitution du virus de la PPR est schématisé à la Figure 5.

Ce système de reconstitution a été appliqué pour obtenir un clone infectieux à partir de l'ADNc du génome entier de PPRV 75/1 en remplaçant le minigénome eGFP par cet ADNc. Autrement dit, le plasmide passemlage4term, contenant le génome entier incluant les erreurs observées par rapport à la séquence initiale, a été utilisé. En effet, les erreurs dans la séquence L dans le plasmide passemlage4term sont également présentes dans le plasmide contenant le gène L sous pT7. Or, celui-ci a été utilisé avec succès en essai fonctionnel du minigénome eGFP sur des cellules 293-T7 (résultats non montrés).

#### **A/ Essais sur cellules 293-T7 et sur cellules Vero**

Les deux premiers essais de reconstitution du virus PPRV 75/1 ont été réalisés par transfection soit sur des cellules 293-T7 exprimant de façon stable l'ARN polymérase T7, soit sur des cellules Vero préalablement infectées avec le virus recombinant Fowlpox-T7 (FP-T7).

Les cellules Vero (cultivées en milieu Eagle modifié (MEM, Eurobio, France) + 1% L-glutamine + 10% de sérum de fœtus de bovin (SVF)) et les cellules 293-T7 (cultivées en milieu de Dulbecco DMEM + 10% SVF) sont préparées en plaque 6 puits et incubées à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub> de façon à être à 60-80% de confluence à 24 heures, au moment de la transfection.

Les cellules Vero n'expriment pas l'ARN polymérase T7. Il faut donc leur apporter cette enzyme par le biais d'un virus recombinant, en l'occurrence ici le virus recombinant FP-T7. Pour cela, des cellules Vero ont été infectées avec FP-T7 à une multiplicité d'infection (MOI) de 0,1 par cellule. Après 2 heures d'infection, l'inoculum a été retiré et la co-transfection réalisée.

Pour chacun des types cellulaires, le plasmide passemlage4term a été co-transfecté avec les plasmides contenant les gènes N, P et L de PPRV placés soit sous

contrôle de pT7 (plasmides pN-BKS-IREST7, pP-BKS-IREST7, et pLBKS-IREST7) soit de pCMV (plasmides pNPC, pPPC, et pLPC). Dans chacun des cas, le ratio N : P : L était de 20 : 20 : 1.

5                    Deux protocoles de transfection ont été testés en parallèle, l'un utilisant un agent de transfection du commerce, la lipofectamine 2000 (Invitrogen, France), l'autre reprenant la méthode classique par précipitation au chlorure de calcium.

10                    Soixante douze heures après la transfection, les cellules 293-T7 ont été mises en co-culture sur des cellules Vero pour augmenter les chances d'amplifier le virus. Après trois passages successifs sur les cellules Vero, aucun effet cytopathique (ECP) n'est apparu. Il en a  
15 été de même pour les cellules Vero infectées par le FP-T7 puis transfectées. En effet, après quatre passages successifs réalisés à 7 jours d'intervalle chacun, le premier ayant eu lieu 72 heures après la transfection, aucun ECP n'est apparu dans les flacons de culture, quel  
20 qu'ait été la méthode de transfection (lipofectamine ou chlorure de calcium).

                    Un troisième essai de reconstitution du virus PPRV 75/1 a alors été réalisé sur des cellules Vero.DogSLAMtag, qui sont des cellules Vero exprimant un  
25 récepteur au morbillivirus de la maladie de Carré (CDV), le récepteur CD150 (ou SLAM, pour « *signalling lymphocyte activation molecule* ») de chien (Takeda et al., *J. Virol.*, 80(9): 4242-8, 2006). Les Inventeurs ont constaté que ces cellules étaient plus sensibles que les cellules Vero à  
30 l'infection par le virus de la souche vaccinale PPRV 75/1. En effet, une production de la souche virale vaccinale 75/1 sur ces cellules a permis d'obtenir un titre plus élevé d'un Log que celle produite dans les mêmes conditions sur les cellules Vero. De plus, l'évolution de l'infection des  
35 cellules par le virus peut s'observer par la formation de syncytia en nombre, ce qui n'est pas le cas sur les cellules Vero classiques, et l'apparition d'un ECP franc.

Préparées la veille, des cellules Vero.DogSLAMtag ont été préalablement infectées avec FP-T7 à 0,1 MOI par cellule, puis co-transfectées avec les plasmides N, P, L et passemblage4term, en présence de lipofectamine 2000, comme  
5 décrit précédemment pour les cellules Vero.

L'évolution des cellules a été observée quotidiennement au microscope. Ces observations sont illustrées par la Figure 6. Après trois passages sur les cellules Vero.DogSLAMtag, un ECP ténu est apparu. Le  
10 surnageant a été récolté et a servi d'inoculum pour infecter de nouvelles cellules Vero.DogSLAMtag. Huit à neuf jours après cette infection, des foyers similaires à des foyers de PPRV sur des cellules en culture sont apparus à trois endroits différents dans la boîte de culture.  
15 L'aspect des cellules était le même que celui observé lors du précédent passage.

En parallèle, les surnageants des différents passages ont été analysés par RT-PCR, sur cinq passages successifs. A chaque fois, l'ARN total a été extrait avec  
20 le « RNeasy mini kit » (Qiagen, France) et une partie de cet ARN, avant d'être utilisé en RT-PCR, a été traité à la DNase (Ambion, France) afin d'éliminer toute trace éventuelle de plasmides utilisés pour la transfection. La réaction de RT-PCR a été réalisée en une seule étape avec  
25 le « One-step RT-PCR kit » (Qiagen, France), les amorces du gène de ménage  $\beta$ -actine,  $\beta$ act1 et  $\beta$ act2, et les amorces spécifiques de PPRV 75/1, NP3 et NP4 spécifiques du gène N et HP46 et HP47 spécifiques du gène H. Le contrôle de la synthèse d'ADNc a été fait par PCR spécifique du gène de  
30 ménage  $\beta$ -actine. Tous les échantillons ont été amplifiés (résultats non montrés). Par ailleurs, ces mêmes PCR ont été menées directement sur les ARN extraits des surnageants, afin d'en vérifier la qualité.

Les produits de PCR et RT-PCR ont été analysés  
35 sur gel d'agarose (Figure 7). La Figure 7a montre les résultats de la RT-PCR spécifique de N-PPRV, obtenus avec les amorces NP3 et NP4. La Figure 7b montre les résultats



de la RT-PCR spécifique de H-PPRV, obtenus avec les amorces HP46 et HP47. Dans les Figures 7a et 7b, la partie du haut correspond à la PCR directe sur ARN et la partie du bas à la RT-PCR. Les différentes pistes sont les suivantes :

5 « + » : contrôle positif de PCR ; « - » : contrôle négatif de PCR ; 1 : surnageant du passage 3 ; 2 : surnageant du passage 4 ; 3 : surnageant du passage 5 ; D : ARN traité à la DNase ; d : ARN dilué afin d'être dans les mêmes conditions que l'ARN traité à la DNase.

10 Aucune amplification n'a été observée après PCR directe sur les ARN, ce qui indique qu'il n'y a pas de traces d'ADN plasmidiques dans les surnageants testés. Tous les échantillons ont été amplifiés après réaction de RT-PCR spécifique de la N-PPRV. Seul le passage 5 n'a pas été

15 amplifié dans le cas de la RT-PCR spécifique de la H-PPRV. Cette dernière observation peut s'expliquer par une quantité d'ARN trop faible pour être détectée ou par une dilution de l'échantillon trop importante pour pouvoir détecter la H-PPRV par RT-PCR.

## 20 **B/ Obtention du clone infectieux sur cellules CHS-20**

Le clone infectieux selon l'invention a pu être généré sur des cellules CHS-20 pour lesquelles il a été démontré qu'elles étaient réceptives au virus de la PPR (Adombi et al, *J. Virol. Methods*, 173 : 306-313, 2011). Les

25 cellules CHS-20 sont des cellules de la lignée cellulaire CV-1 (ATCC n° CCL-70) modifiées pour exprimer la protéine SLAM de la chèvre (GenBank n° DQ228869).

Des cellules CHS-20 ont été préparées et transfectées de la même manière que décrit plus haut pour

30 les cellules Vero.DogSLAMtag : préparation des cellules 24h à l'avance pour être à 60-80% de confluence, infection avec le FP-T7 à 0,1 MOI par cellule pendant 2h, puis transfection avec les 4 plasmides pNPC, pPPC, pLPC et passemblage4term en présence de lipofectamine 2000.

En parallèle, 72 heures après transfection, une RT-PCR quantitative (RT-qPCR) a été réalisée sur le gène N, selon le protocole établi par Kwiątek et al. (*J. Vir. Methods*, 165 :168-177, 2010), afin de déterminer le titre viral pour le virus parental (Tableau 1) et pour le clone infectieux (Tableau 2) sur cellules CHS-20. Dans les deux tableaux ci-dessous, le signe « + » indique qu'une amplification a pu être obtenue et le signe « - » indique qu'aucune amplification n'a été obtenue ; les colonnes 1 à 10 correspondent à 10 répétitions de la même dilution ; des cellules non infectées ont servi de témoin.

25

[illegible]

Tableau 2:

| Dilution  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|-----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| $10^0$    | + | + | + | + | + | + | + | + | + | +  |
| $10^{-1}$ | - | + | + | + | + | + | - | + | + | -  |
| $10^{-2}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| $10^{-3}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| $10^{-4}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| $10^{-5}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| $10^{-6}$ | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |
| témoin    | - | - | - | - | - | - | - | - | - | -  |

Afin de confirmer les résultats de RT-PCR, les surnageants récoltés ont été titrés par immunofluorescence indirecte en comparaison avec la souche vaccinale PPRV 75/1 d'origine. Des cellules Vero.DogSLAMtag, à raison de  $2 \cdot 10^4$  cellules par puits d'une plaque 96 puits, ont été infectées avec des dilutions de 10 en 10 des surnageants récoltés aux différents passages du clone infectieux PPRV 75/1. Après cinq jours d'incubation à  $37^\circ\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$ , les cellules ont été fixées à l'acétone 80%. La révélation a été faite à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-N-PPRV 38-4 dilué au 1/400 et le conjugué anti-souris FITC (Biorad, France) dilué au 1/80. Les plaques ont été lues au microscope à fluorescence. Le titre T est donné en  $\text{DICT}_{50}/\text{ml}$  et a été calculé selon la formule :

$$T = 10^{f-t},$$

dans laquelle  $t = X_0 - d \cdot (P - 0,5)$  ;  $f = \log 20 = 1,3$  (50  $\mu\text{L}$  de suspension virale par puits) ;  $X_0 = \log$  de la dernière dilution où 100% des puits de cette dilution présentent un ECP ;  $P$  = somme des puits présentant un ecp à partir de la dilution présentant 100% d'ECP;  $d = \log$  du facteur de dilution (ici  $d = 1$  car dilution de 10 en 10).

Le titre viral obtenu pour le virus parental est  $T = 10^{-5,7}$   $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$  alors que celui pour le clone infectieux est  $T = 10^{-2,2}$   $\text{DICT}_{50}/\text{mL}$ . Le titre viral pour le clone infectieux est donc plus faible d'environ 3 logarithmes en base 10 ( $\log_{10}$ ) par rapport au virus parental PPRV 75/1. Cette différence peut être directement

imputée aux mutations portées par le clone infectieux par rapport à la souche virale parentale.

**EXEMPLE 3 : IDENTIFICATION DE MARQUEURS POUR LE VACCIN CONTRE LA PPR.**

5                   La stratégie de marquage choisie repose sur la substitution d'un épitope fortement immunogène par une autre séquence immunogène, n'entraînant pas de réaction immunitaire croisée avec l'épitope d'origine pour permettre la distinction par tests immuno-sérologiques entre animaux  
10 vaccinés et animaux infectés. Un épitope hautement immunogène et spécifique de la peste des petits ruminants, le peptide E, a pu être identifié dans la partie C-terminale de la protéine N-PPRV 75/1, entre les acides aminés 484 et 495, en suivant la procédure PEPSCAN (Geysen  
15 et al., PNAS, 81(13) :3998-4002, 1984).

Dans un premier temps, il a été envisagé de marquer le gène N avec la séquence d'un Tag commercial, déjà utilisé pour des marquages en biologie moléculaire et pour lesquels il existe des réactifs de diagnostic en ELISA  
20 compétitive ou un anticorps monoclonal commercial. Après un inventaire des différents Tag disponibles sur le marché (Guy et al., *Ann Neurol*, 52(5): 534-42, 2002 ; Lee et al., *J Immunol Methods*, 307(1-2) : 62-72, 2005 ; Roche, *Epitope Tagging Basic Laboratory Methods*, chap. 1, 2000 ; Terpe,  
25 *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(5): p. 523-33, 2003), trois candidats ont été testés : les peptides FLAG et c-myc et la protéine C, dont les séquences respectives en acides aminés sont indiquées dans le Tableau 3 ci-dessous.

Tableau 3 :

| Nom du peptide | Origine                              | Séquence     | SEQ ID NO. |
|----------------|--------------------------------------|--------------|------------|
| FLAG           | peptide synthétique                  | DYKDDDDK     | 6          |
| c-myc          | protéine du gène humain <i>c-myc</i> | EQKLISEEDL   | 2          |
| protéine C     | protéine C                           | EDQVDPRLIDGK | 3          |

Dans un second temps, il a été envisagé de remplacer la séquence codant pour le peptide E par une séquence homologue dérivée d'un autre morbillivirus que la PPR. La Figure 9 montre un alignement des séquences protéiques de différents morbillivirus dans la zone homologue du peptide E. Le remplacement du peptide E de PPRV 75/1 par la séquence correspondante d'un autre morbillivirus doit permettre de marquer le vaccin tout en restant le plus proche possible d'un fond génétique morbillivirus afin de limiter les conséquences fonctionnelles de la modification du génome. Cependant, la modification doit aussi être suffisante pour qu'elle ait une incidence sur l'antigène utilisé dans le diagnostic. Dans ce but, il est important de choisir un morbillivirus suffisamment éloigné de PPRV afin d'éviter les réactions croisées. Ainsi, le choix s'est porté sur les séquences du virus de la maladie de Carré (CDV, peptide 2), du virus du phoque (PDV, peptide 3), et du morbillivirus du dauphin (peptide 4). En outre, une séquence chimère (peptide 1) reprenant les acides aminés les plus fréquemment trouvés à chaque position sur les différents morbillivirus a été définie et synthétisée. Les séquences des différents peptides testés sont récapitulées dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 :

| peptide | origine                     | séquence     | SEQ ID NO. |
|---------|-----------------------------|--------------|------------|
| E       | PPRV, souche vaccinale 75/1 | NPREAQRSAEAL | 14         |
| 1       | chimère synthétique         | DPDDDRKSAEAL | 7          |
| 2       | CDV                         | GNDDDRKSMEAI | 8          |
| 3       | PDV                         | DHDNDQQSMDGL | 9          |
| 4       | morbillivirus de dauphin    | DPISIQKSAEAL | 4          |

Les différents peptides Tag et morbillivirus ont été évalués sur leur pouvoir immunogène chez le lapin et la chèvre. Pour cela, les peptides Tag sont injectés chez la chèvre par voie intramusculaire, à raison de 1 ml à 1 mg/ml mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Une injection de rappel est faite dans les mêmes conditions trois semaines plus tard. Les prélèvements sanguins sont réalisés toutes les semaines et les sérums sont récoltés et testés en ELISA. En parallèle, des lapins ont été immunisés afin de générer des sérums polyclonaux contre les différents peptides morbillivirus pour leur utilisation comme sérum de contrôle positif dans les tests de sérologie associés au vaccin. Le lapin est l'espèce idéale pour produire une quantité importante de sérums polyclonaux. Une première injection de 1 ml de peptide (à une concentration de 1 mg/ml) mélangé à 1 ml d'adjuvant complet de Freund est faite aux lapins par voie sous-cutanée. Deux injections de rappel sont réalisées à 15 jours d'intervalle. Les lapins sont anesthésiés (Imalgen, Sanofi, France), puis saignés pour récolter le maximum de sang. Les sérums sont récoltés et testés en ELISA, en comparaison avec le peptide E. Les résultats des tests ELISA ont montré que, parmi les peptides testés, seuls le peptide c-myc, la protéine C, et le peptide 4 (dérivé de morbillivirus de dauphin) sont suffisamment immunogènes (Figure 10).

La séquence codant pour le peptide E dans la nucléoprotéine du PPRV 75/1 a été substituée par celle du peptide 4 du morbillivirus de dauphin. L'expression et la fonctionnalité de cette nucléoprotéine modifiée ont été

vérifiées à l'aide du système de reconstitution du minigénome eGFP.

Dans un premier temps, afin de s'assurer que les mutations, réalisées sur le gène N-PPR, n'affectent pas la production de la protéine, l'expression des gènes N mutés ou non mutés a été vérifiée par immunofluorescence, directe ou indirecte. Pour cela, les plasmides NPC, correspondant au plasmide incluant le gène codant la protéine N non mutée, et NPCmutdauph, correspondant au plasmide incluant le gène codant la protéine N intégrant le peptide de dauphin, ont été utilisés pour transfecter des cellules Vero.

La transfection a été réalisée avec la lipofectamine 2000 sur des cellules Vero de 24h, confluentes à 70-80%. Les cellules ont été mises en culture, la veille, à raison de  $2.10^4$  cellules par puits, dans une plaque P96. Les différentes dilutions d'ADN et de lipofectamine 2000 ont été réalisées dans le milieu OptiMEM® (Invitrogen, France) pour une optimisation de la transfection. Après 24h, 48h ou 72h d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules ont été fixées au paraformaldéhyde (PFA). Après trois lavages en PBS 1X, 50 µL de PFA 3% a été laissé au contact des cellules pendant 30 minutes, à température ambiante. Après trois nouveaux lavages en PBS 1X, les cellules ont été recouvertes avec 50 µL de NH<sub>4</sub>Cl à 50 mM et incubées pendant 20 minutes à température ambiante.

L'anticorps anti-peptide E est un polyclonal de lapin, spécifique du peptide E. Ce peptide est présent uniquement chez les nucléoprotéines de PPRV et employé à une dilution au 1/10. Un anticorps conjugué FITC, spécifique des IgG de lapin et dilué au 1/80, a ensuite été ajouté. L'anticorps anti-peptide 4 est un polyclonal de lapin, spécifique du peptide 4. Ce peptide est présent uniquement chez les nucléoprotéines de DMV et a été employé à une dilution au 1/10. L'anticorps monoclonal 38-4 (reconnaissant le motif constitué des acides aminés 116 à

150 de la nucléoprotéine de PPRV) de souris utilisé est directement couplé au fluorochrome TRITC. Son utilisation dans les kits de diagnostic peut permettre la différenciation entre la fluorescence rouge, due aux  
5 nucléoprotéines de morbillivirus, et la fluorescence verte, induite par la présence de nucléoprotéines mutées spécifiques du marqueur (peptide 4). Pour cet anticorps, la dilution optimale a été établie à l'aide d'une gamme de dilutions du 1/25 au 1/400.

10 La Figure 11 montre les résultats d'expression *in vitro* de la protéine N modifiée mesurée par immunofluorescence (grossissement x20). La révélation de la plaque P96 où l'on a transfecté les plasmides NPC et NPCmutdauph permet de détecter la présence de  
15 nucléoprotéines. La fluorescence rouge relative à l'anticorps 38-4 conjugué TRITC met en évidence l'ensemble des protéines N-PPR qu'elles soient mutées ou non (Figure 11 a et b). La fluorescence verte est induite par la détection du peptide 4 par l'anticorps anti-peptide 4 et  
20 l'anticorps anti-IgG de lapin conjugué FITC. Elle permet ainsi de différencier les nucléoprotéines mutées de celles qui ne le sont pas (Figure 11 c et d). De même, la fluorescence verte, observée à la Figure 11 e et f, permet de mettre en évidence la présence du peptide E, c'est-à-  
25 dire la présence de nucléoprotéines non mutées.

Le gène N-PPR du plasmide NPC a induit la production de nucléoprotéines (Figure 11 a) présentant le peptide E (Figure 11 e). L'absence de fluorescence observée lors de la révélation avec l'anticorps anti-peptide 4 sur  
30 ces mêmes cellules (Figure 11 c) confirme qu'il n'y a pas de réaction croisée entre l'anticorps anti-peptide 4 et le peptide E. De la même façon, le gène N-PPR muté du plasmide NPCmutdauph a permis la production de nucléoprotéines (Figure 11 b) présentant le peptide 4 (Figure 11 d). Le  
35 site du peptide E ayant disparu, aucune fluorescence n'est observée lors de la révélation avec l'anticorps spécifique du peptide E (Figure 11 f). Ceci confirme bien l'absence de



réaction croisée entre l'anticorps anti-peptide E et le peptide 4.

Dans un deuxième temps, la fonctionnalité de la protéine N modifiée a été vérifiée à l'aide du mini-génome eGFP.

Pour cela, les plasmides du mini-génome et ceux codant respectivement la protéine N (N modifiée ou non), la protéine P, et la protéine L, ont été transfectés selon le ratio 20 : 20 : 20 : 1 comme précédemment, à l'aide de lipofectamine 2000, sur des cellules Vero de 24h et à 60-70% de confluence réparties en plaque 12 puits. Le ratio ADN:transfectant utilisé a été de 1:3.

Le contrôle positif a consisté à transfecter les cellules possédant l'ARN T7 polymérase avec le mini-génome puis à les infecter avec la souche vaccinale PPRV75/1, à une concentration de 1 DITC<sub>50</sub>. Le contrôle négatif, quant à lui, a été obtenu en l'absence de plasmide codant la polymérase L.

48h après la transfection, les plaques ont d'abord été observées au microscope à fluorescence. La Figure 12 montre les résultats de la détection de la fluorescence eGFP dans les cellules. Les photographies de la ligne supérieure sont celles dans l'UV, la ligne inférieure montrant les mêmes photographies dans le visible. Des cellules fluorescentes ont été observées pour les témoins positifs (Fig. 12 b et d) et l'essai avec la protéine N modifiée (Fig. 12 c). Aucune fluorescence n'a été obtenue avec le témoin négatif (Fig. 12 a).

Pour confirmer ces résultats, la présence d'ARNm correspondant à la protéine N modifiée a été recherchée. Les ARN<sub>t</sub> ont été extraits des cellules 48h après la transfection à l'aide du kit « RNeasy Mini Kit » (Qiagen, France). Les ARN<sub>t</sub> ont ensuite été dosés au nanodrop. Une PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % a été réalisée afin de vérifier la pureté des ARN<sub>t</sub>. Quand ils étaient purs, une extraction d'ARNm avait lieu. Sinon, les échantillons d'ARN étaient traités à la

DNase à l'aide du kit « *TURBO DNA-free* » (Ambion). Une PCR suivie d'une électrophorèse sur gel d'agarose des ARN<sub>t</sub> traités à la DNase a alors été réalisée afin de s'assurer de leur pureté. L'ARN<sub>m</sub> a ensuite été extrait des ARN<sub>t</sub> à l'aide du kit « *Oligotex mRNA spin column* » (Qiagen, France). Après plusieurs lavages, l'ARN<sub>m</sub> a été élué. La pureté de ces échantillons a été contrôlée par RT-PCR avec les amorces internes de l'eGFP puis analysée par migration sur gel d'agarose.

Les ARN totaux et ARNm extraits ont donc été soumis à une réaction de transcriptase inverse (RT) à l'aide du kit « *First strand cDNA synthesis* » (GE Healthcare). Le contrôle de la synthèse d'ADN<sub>c</sub> a été réalisé par PCR sur gène de ménage  $\beta$ actine avec les amorces  $\beta$ act1 et  $\beta$ act2. Les amorces eGFP-C1 F et eGFP-C1 R, spécifiques du gène eGFP, ont été utilisées pour amplifier ce gène eGFP présent dans l'ADN<sub>c</sub>. Le fragment amplifié a une taille d'environ 600 paires de bases (pb). Les séquences des différentes amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 5 ci-dessous.

Tableau 5 :

| Amorce       | Séquence               | SEQ ID NO. |
|--------------|------------------------|------------|
| $\beta$ act1 | ACCAACTGGGACGACATGGAGA | 10         |
| $\beta$ act2 | AGCTGGTCCTGCTCGAAGTC   | 11         |
| eGFP-C1 F    | CTGGTCGAGCTGGACGGCGACG | 12         |
| eGFP-C1 R    | CACGAACTCCAGCAGGACCATG | 13         |

La réaction de PCR a été réalisée selon les instructions du fournisseur de l'enzyme *Taq DNA polymérase* (Qiagen, France) ainsi que selon le programme décrit dans le Tableau 6 ci-dessous. 50-100 ng d'ADN ou ARN ont été ajoutés dans chaque tube. Le témoin négatif a consisté en de l'eau et le témoin positif en un plasmide peGFP-C1 contenant le gène d'intérêt codant pour l'eGFP.

Tableau 6 :

| Etapes                                    | Température | Temps       | Nombre de cycles |
|---|-------------|-------------|------------------|
| Activation de l'enzyme Taq DNA Polymerase | 94°C        | 3 minutes   |                  |
| Dénaturation                              | 94°C        | 30 secondes | x 30 cycles      |
| Hybridation                               | 50°C        | 30 secondes |                  |
| Elongation                                | 72°C        | 1 minute    |                  |
|   | 72°C        | 5 minutes   |                  |

Les produits de PCR ont ensuite été analysés sur un gel d'agarose 1 % en tampon Tris acétique EDTA (TAE) 1X, auquel a été ajouté 5µL de REDGEL® (Interchim, France). 2,5 µL de bleu de charge ont été ajoutés à chaque produit de PCR, et 12 µL de chaque échantillon ont été déposés dans les puits. Après environ 1 heure de migration à 120V, la visualisation du résultat a été faite sous UV à l'aide d'un gel imageur (Biorad).

La Figure 13 montre les résultats de RT-PCR (1 : Témoin négatif PCR ; 2 : Témoin positif PCR ; 3 : Marqueur 100 pb ; 4 : Cellules seules ; 5 : Cellules + minigénome ; 6 : Cellules + minigénome + N + P + L ; 7 : Cellules + minigénome + N modifiée + P + L ; 8 : Cellules + minigénome + PPR). Pour les ADN<sub>c</sub> issus des ARN<sub>t</sub>, il y a amplification du gène eGFP pour tous les échantillons et le témoin positif PCR (Figure 13 a). Pour les ADN<sub>c</sub> obtenus à partir des ARN<sub>m</sub>, l'amplification du gène eGFP n'est présente que pour les échantillons 6, 7 et 8 (Figure 13 b). Le résultat de PCR confirme bien celui observé par la lecture au microscope à fluorescence. La nucléoprotéine N-PPRV 75/1 modifiée par substitution et clonée sous pCMV est bien fonctionnelle.

**REVENDEICATIONS**

1. Procédé d'obtention d'un clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants, comprenant des étapes de :

a) obtention d'un plasmide de clonage incluant l'ADNc du génome complet du virus de la peste des petits ruminants, sous  
5 contrôle du promoteur de la polymérase T7 ;

b) transfection de cellules CV-1 ou Vero, transformées pour exprimer le récepteur SLAM de la chèvre, et exprimant la polymérase T7, avec le plasmide de clonage et avec des plasmides incluant respectivement l'ADNc des gènes N, P et L  
10 du virus ;

c) mise en culture des cellules transfectées et amplification du clone infectieux ;

lequel procédé est caractérisé en ce que l'étape a) comprend en outre le marquage de l'ADNc du génome complet dudit virus  
15 par substitution d'un fragment de cet ADNc codant pour un épitope endogène choisi dans la partie C-terminale de la protéine N et ayant pour séquence  $X_1X_2\text{REAQRSAL}$  (SEQ ID NO : 1) dans laquelle  $X_1$  représente T ou N, et  $X_2$  représente S ou P, par un fragment codant pour un épitope exogène.

20 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le génome viral est celui du virus de la peste des petits ruminants de la souche vaccinale Nigéria 75/1.

3. Procédé selon une quelconque des revendications 1 ou 2, dans lequel l'épitope exogène est choisi parmi le peptide SEQ  
25 ID NO. : 2 dérivé de la protéine c-myc, le peptide SEQ ID NO. : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin.

4. Virus recombinant marqué de la peste des petits ruminants, obtenu par le procédé selon l'une quelconque des  
30 revendications 1 à 3.

5. Molécule d'ADNc codant pour le virus selon la revendication 4.

6. Plasmide contenant une molécule d'ADNc selon la revendication 5.

7. Cellule-hôte transformée avec un plasmide selon la revendication 6.

8. Virus recombinant selon la revendication 4, pour son utilisation comme vaccin prophylactique ou thérapeutique  
5 contre la peste des petits ruminants.

9. Vaccin marqué contre la peste des petits ruminants, caractérisé en ce qu'il comprend le virus recombinant selon la revendication 4.

10. Kit de diagnostic sérologique de la peste des petits ruminants, caractérisé en ce qu'il contient au moins un anticorps dirigé spécifiquement contre un épitope dans la partie C-terminale de la protéine N du virus de la peste des petits ruminants, ayant pour séquence SEQ ID NO. : 1, et au moins un anticorps anti-marqueur dirigé spécifiquement contre  
15 un épitope marqueur choisi parmi le peptide SEQ ID NO. : 2 dérivé de la protéine c-myc, le peptide SEQ ID NO. : 3 dérivé de la protéine C, et le peptide SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin.

11. Procédé de marquage d'un clone infectieux du virus de la peste des petits ruminants, comprenant la substitution d'un  
20 fragment de l'ADNc dudit virus codant pour un épitope de séquence SEQ ID NO. 1, par un fragment codant pour un second épitope choisi parmi le peptide SEQ ID NO. : 2 dérivé de la protéine c-myc, le peptide SEQ ID NO. : 3 dérivé de la  
25 protéine C, et le peptide SEQ ID NO. : 4 dérivé de la protéine N du morbillivirus de dauphin.

1/10

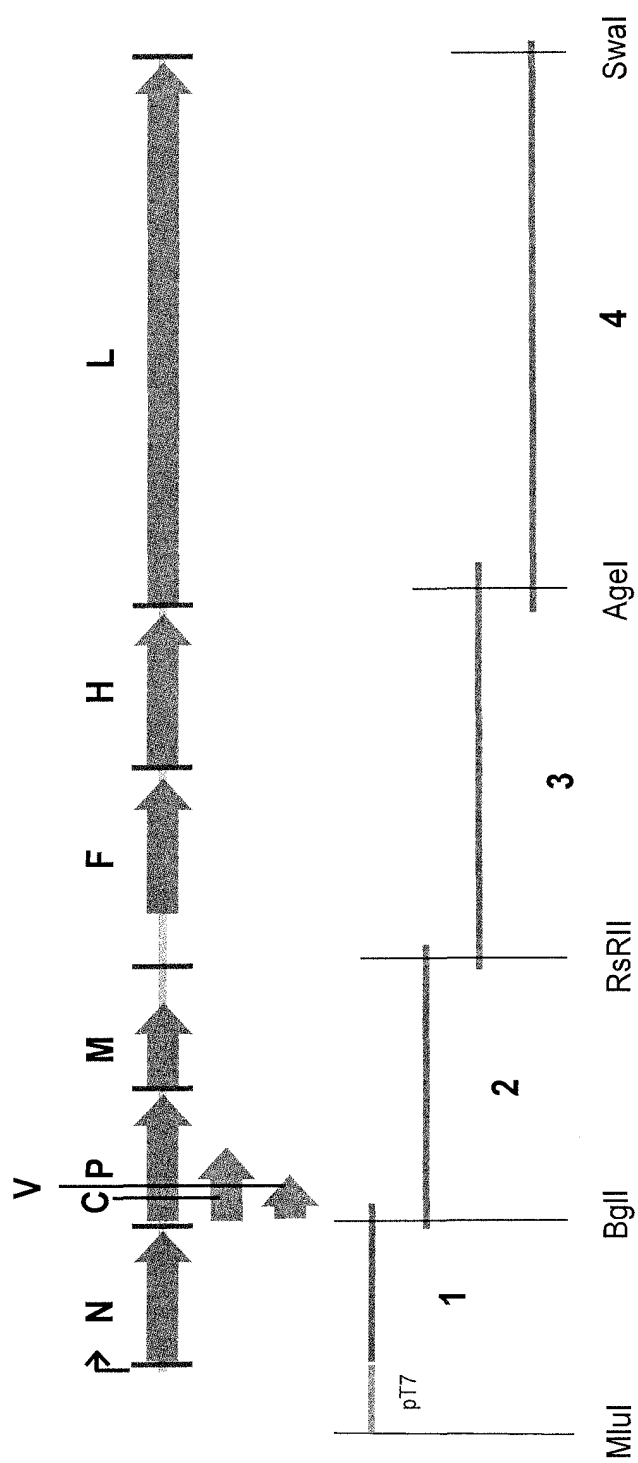


FIGURE 1

FIGURE 2

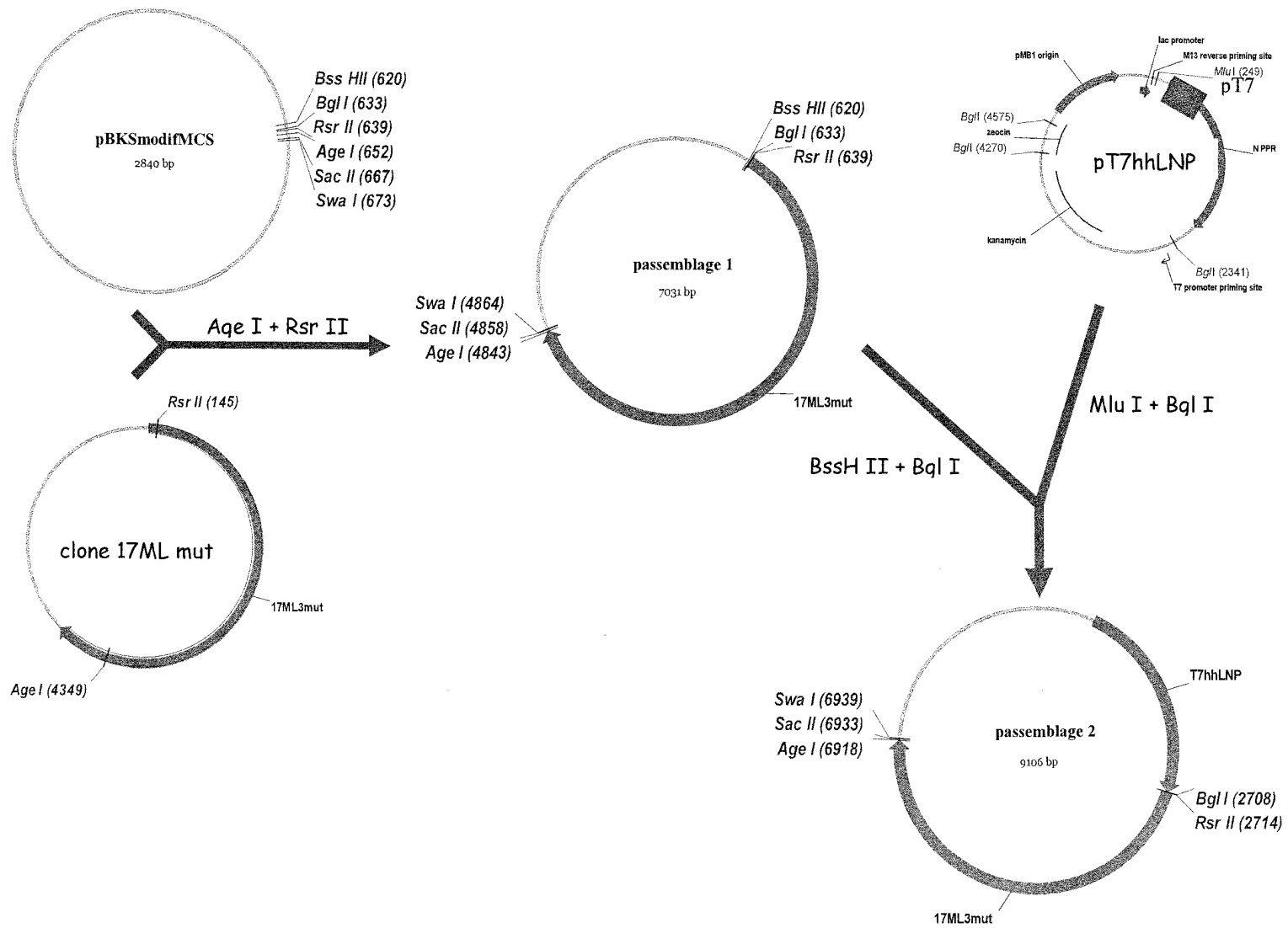
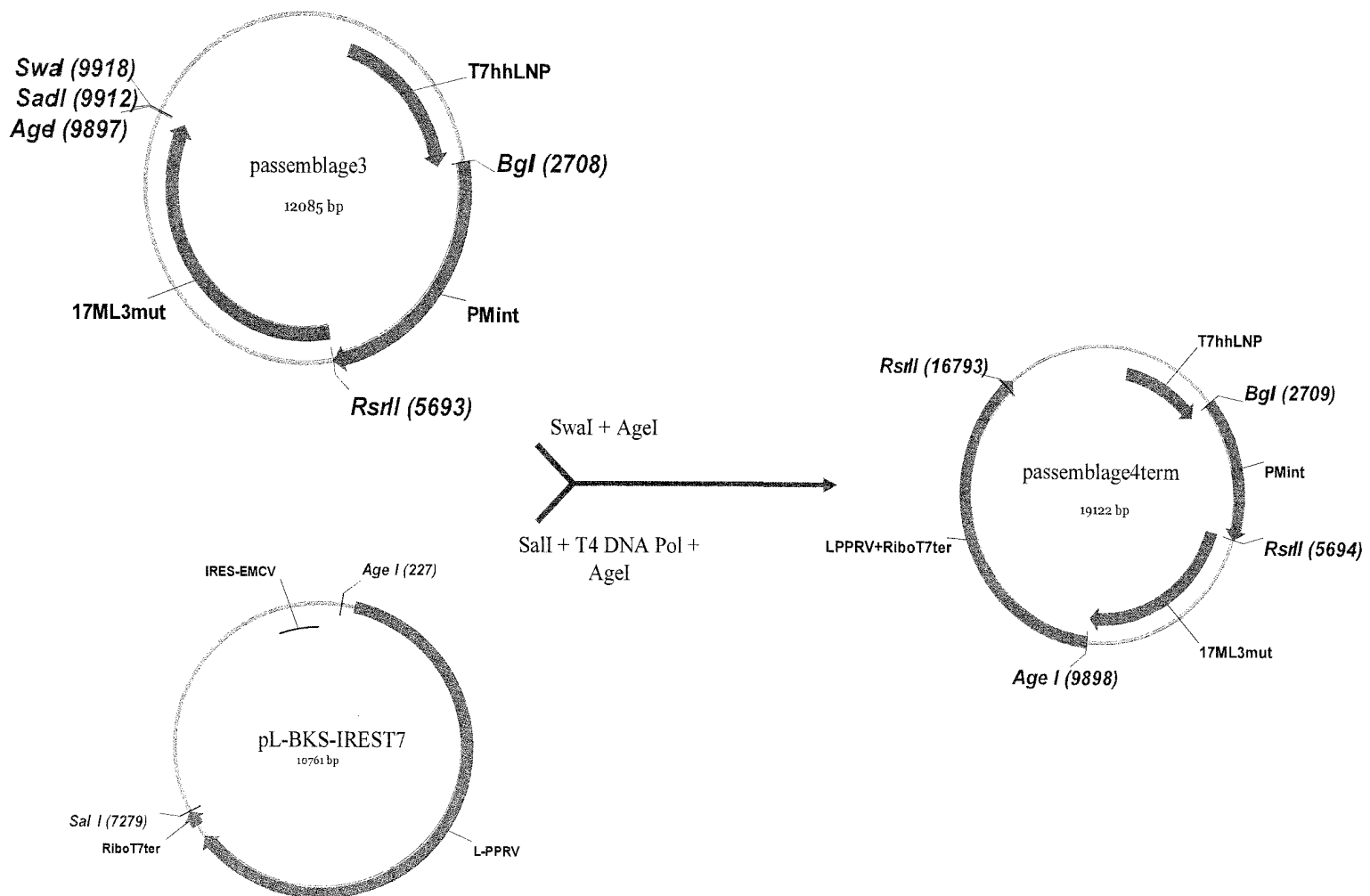


FIGURE 3





4/10

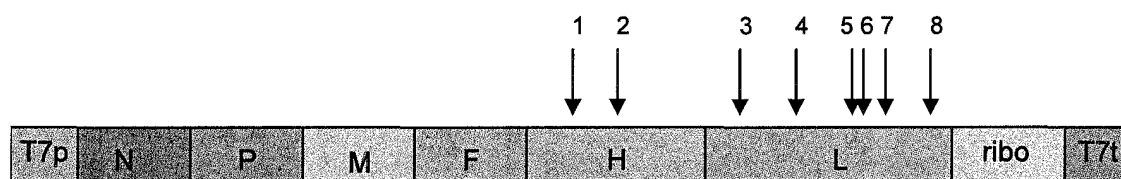


FIGURE 4

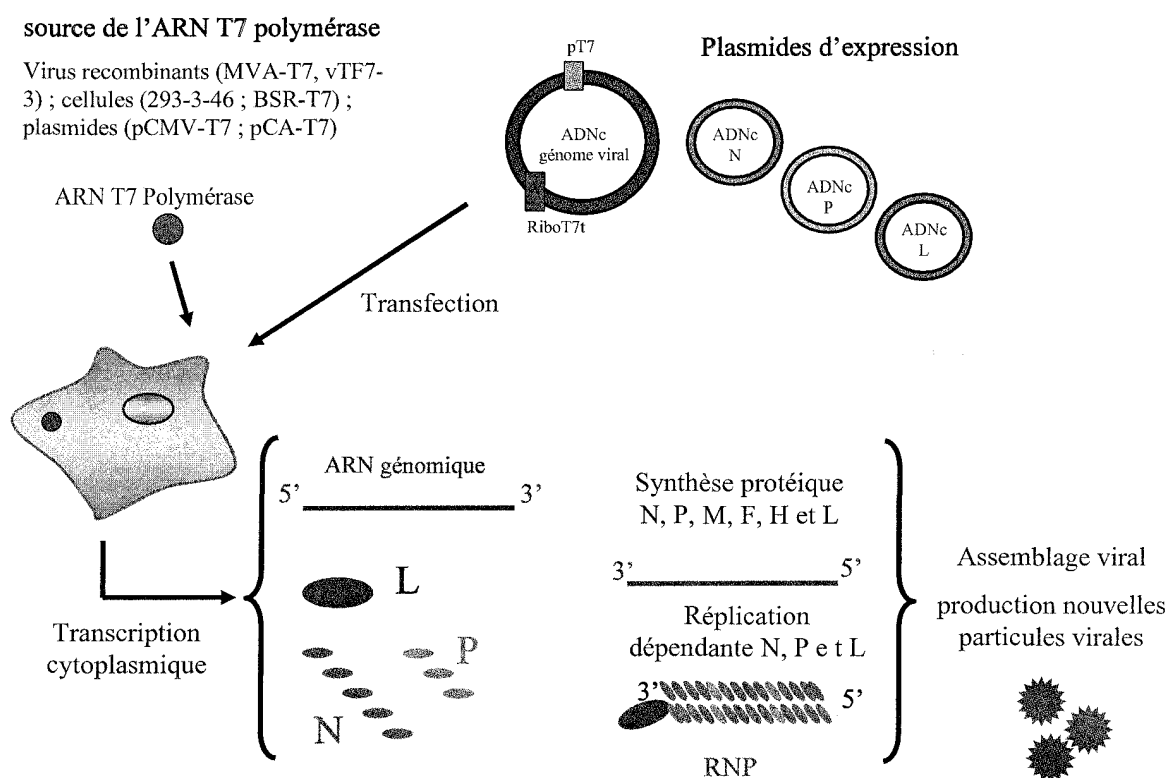


FIGURE 5

5/10

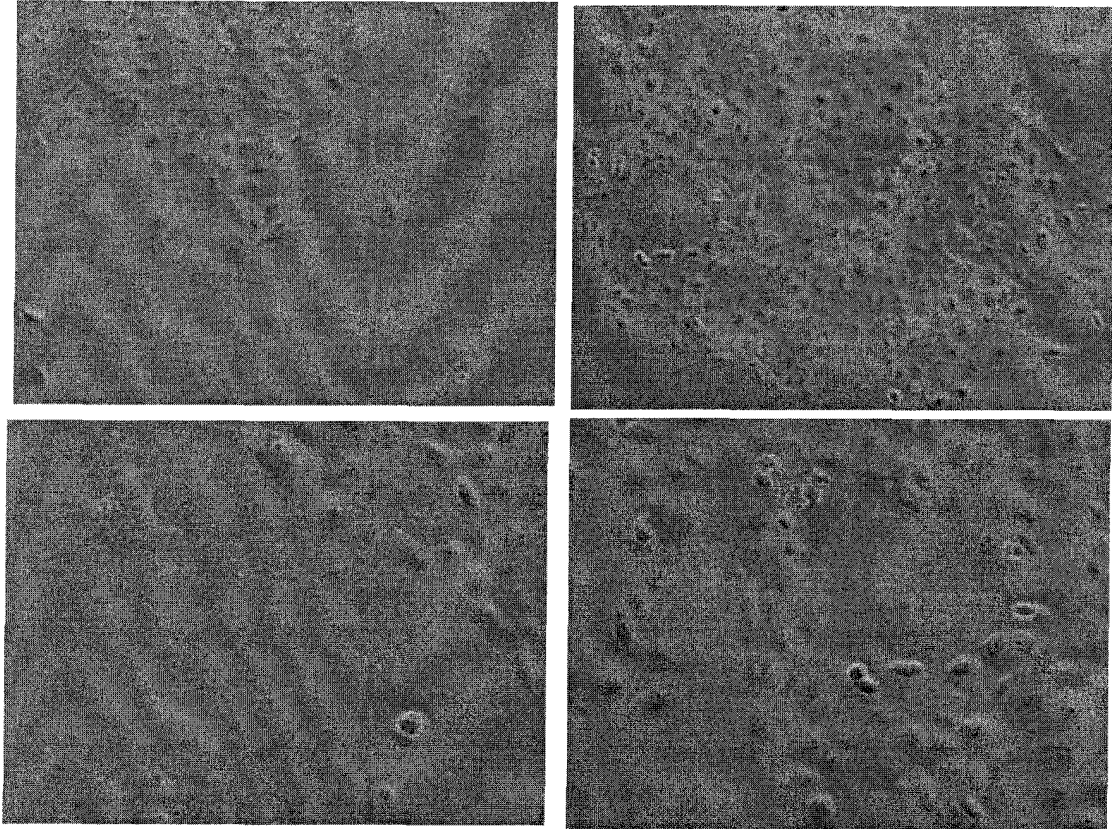


FIGURE 6

6/10

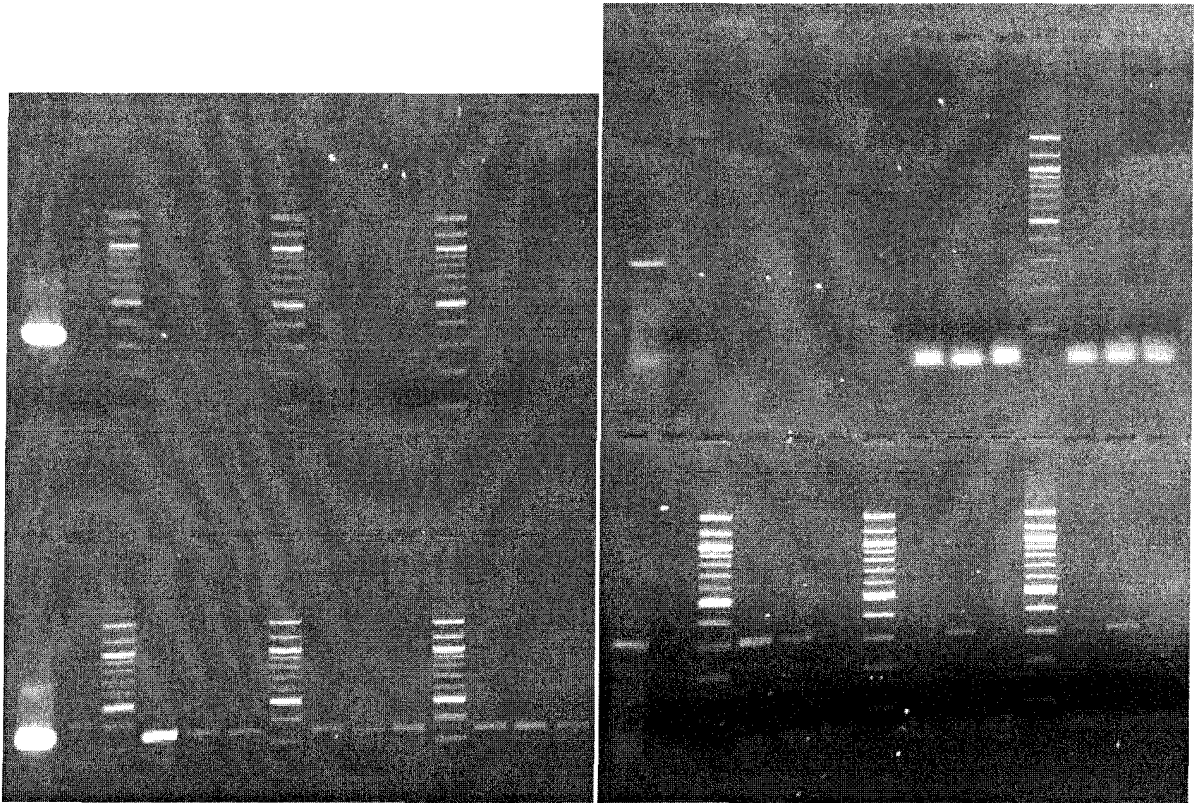


FIGURE 7

7/10

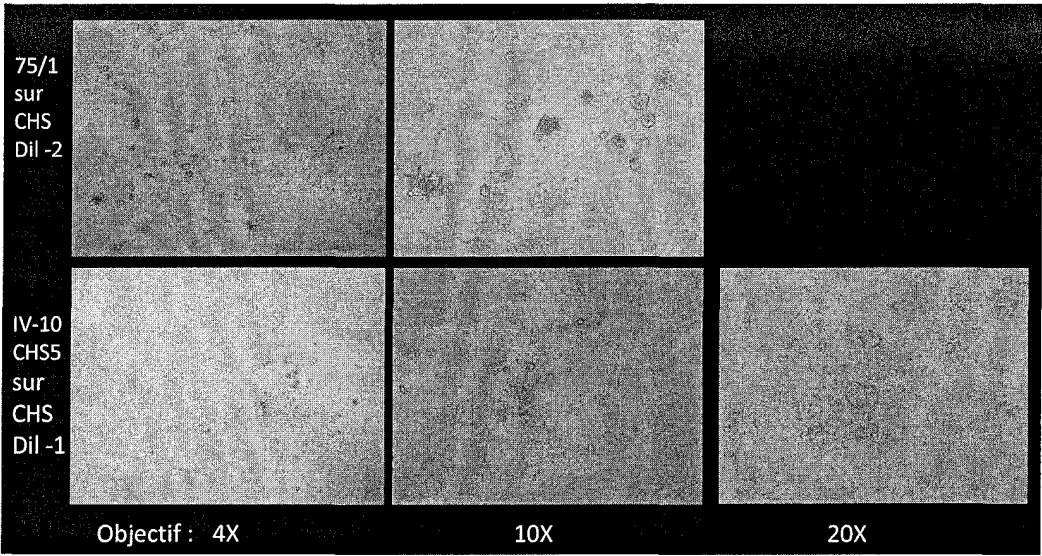


FIGURE 8

|                       |        |      |
|-----------------------|--------|------|
|                       | 480    | 502  |
| PPR 75/1              | ESSQNP | REAQ |
| CDV                   | ESSQNP | REAQ |
| Morbillivirus Dauphin | ESSQNP | REAQ |
| PDV                   | ESSQNP | REAQ |
| RPV                   | ESSQNP | REAQ |
| MV                    | ESSQNP | REAQ |

FIGURE 9

8/10

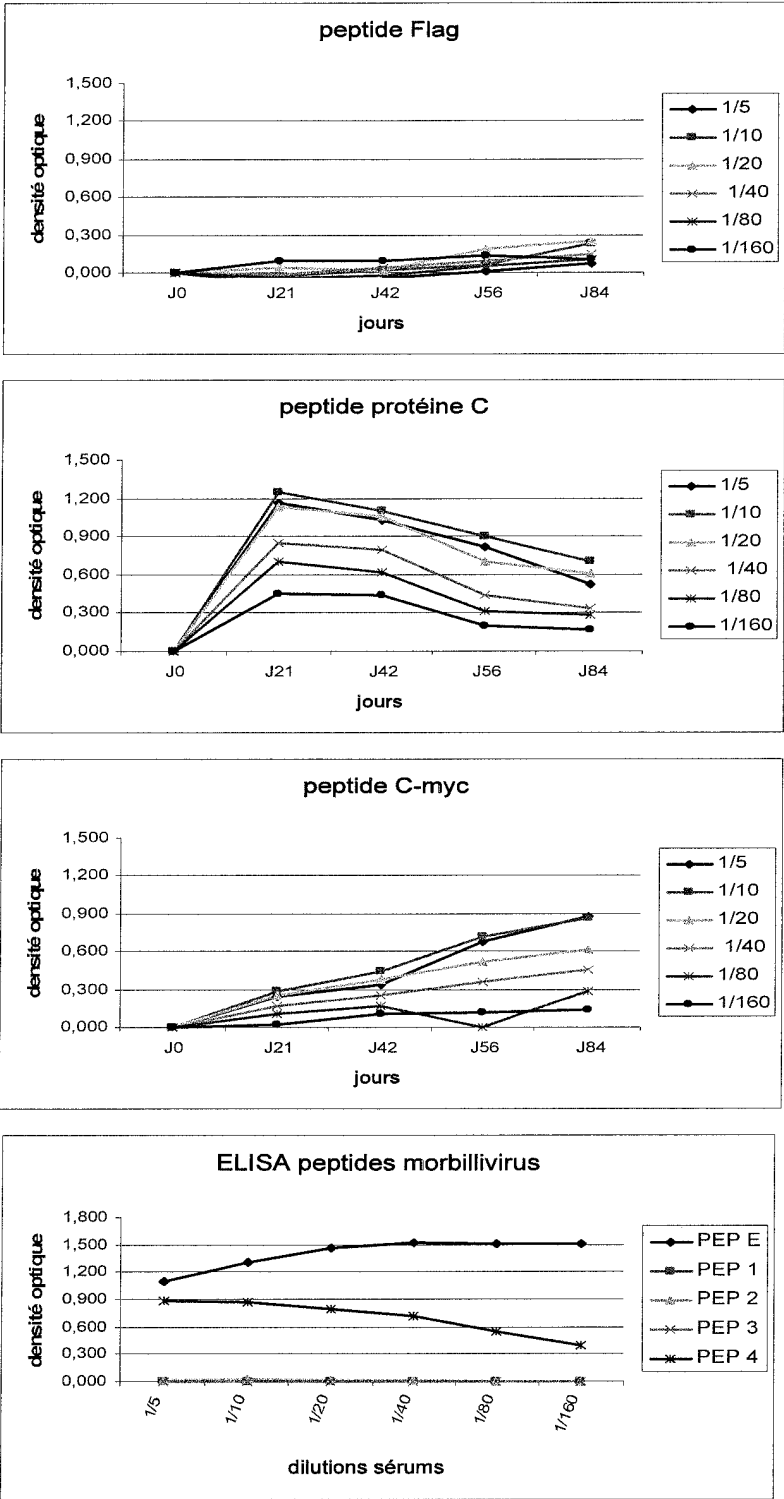


FIGURE 10

9/10

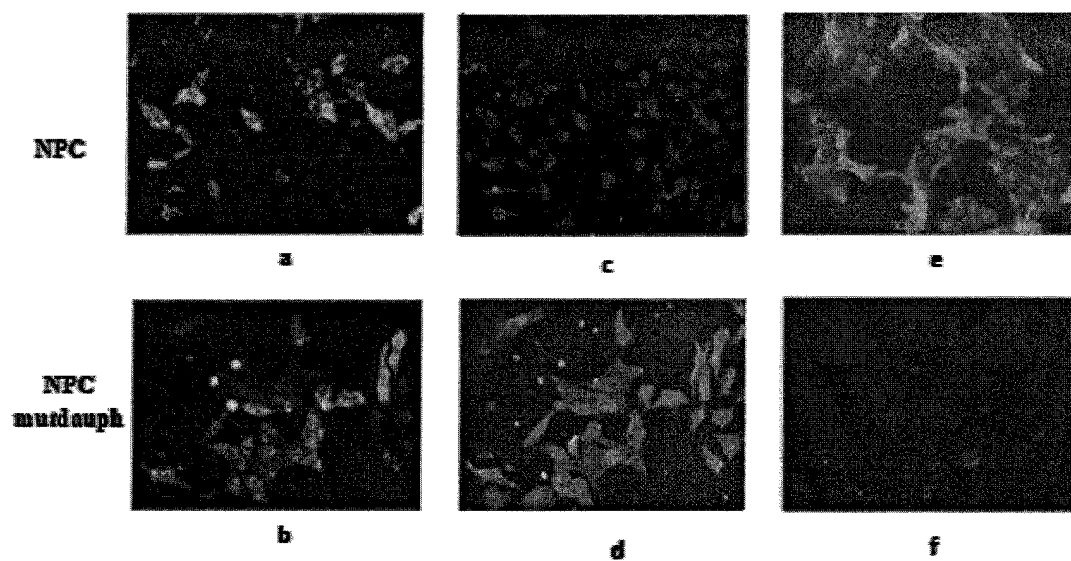


FIGURE 11

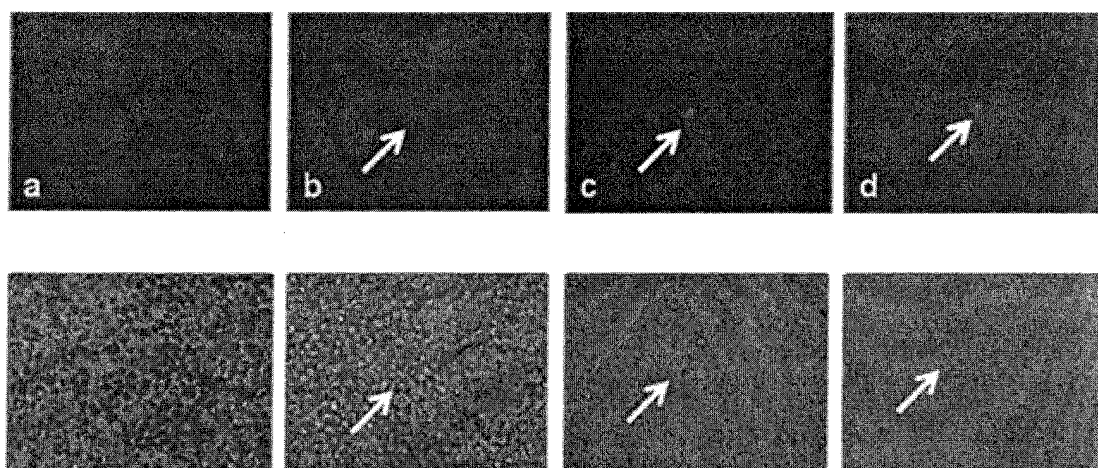


FIGURE 12

10/10

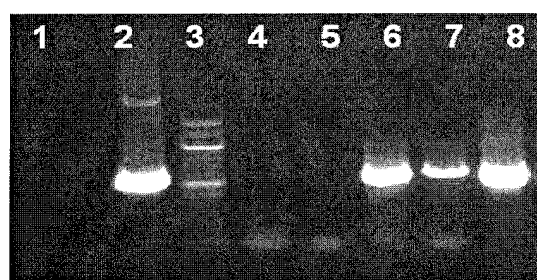
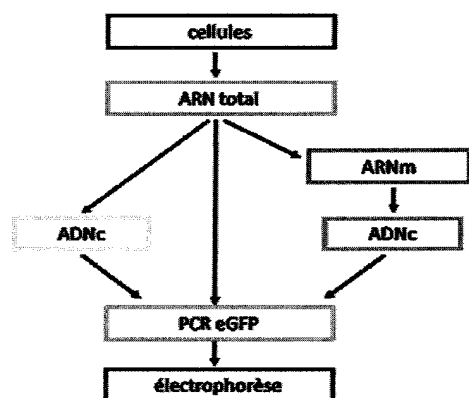


FIGURE 13

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt  
SEQUENCE LISTING

```

<110> Centre de coopération internationale en recherche
       agronomique pour le développement (CIRAD)
<120> souche vaccinale marquée du virus de la peste des petits
       ruminants, et son procédé d'obtention
<130> F1367/25/FR
<140> FR 12 57980
<141> 2012-08-24
<160> 16
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Virus de la peste des petits ruminants

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa = Thr ou Asn

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa = Ser ou Pro

<400> 1
Xaa Xaa Arg Glu Ala Gln Arg Ser Ala Glu Ala Leu
1          5          10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
1          5          10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
1          5          10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> morbillivirus de dauphin

<400> 4

```



## F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

Asp Pro Ile Ser Ile Gln Lys Ser Ala Glu Ala Leu  
 1 5 10

<210> 5  
 <211> 15948  
 <212> DNA  
 <213> PPRV 75/1

<400> 5  
 accagacaaa gctgggtaag gatagttctt ataatgacta tagactggca aacttaggag 60  
 taaagatcct actgtcgggg agaggaggag gagcaagatc tttgaccatg gctactctcc 120  
 ttaaaagctt ggcatgtgtc aagaggaaca aagacaaagc gcctactgcg tcgggttcag 180  
 gagggggccat ccgggggatt aagaatgtta tcatagtccc cattcccggg gactcatcca 240  
 tcattacccg ttcaagactg ctcgacaggc ttgtcagatt ggccggagat cctgacatca 300  
 acgggtcaaa gctgaccggc gtgatgatca gcatgttatc tttgttcgtg gagtcacccg 360  
 ggcaattgat acagcggatc acagatgatc cagatgttag catccgcctt gttgaggtag 420  
 ttcaaagcac taggtcccag tccgggttga cctttgcac acgtggtgct gatttggaca 480  
 atgaggcaga tatgtatttt tcaactgaag gaccctcgag tggaagtaag aaaaggatca 540  
 actggtttga gaacagagaa ataatagaca tagagggtgca agatgcagaa gagttcaata 600  
 tgttgtagc ctccatctta gcacaagttt ggatcctcct ggccaaggcg gttacggcac 660  
 cggatacggc agctgactca gaactgagaa ggtgggttaa atacacacaa caaaggagag 720  
 tgattgggga atttcgcctt gacaaagggg ggctggacgc agtccgcaac aggattgcag 780  
 aagatctatc acttcggcgg ttcattggtat ctctcatact tgacatcaaa aggacccccg 840  
 gcaacaagcc aaggattgca gaaatgatct gcgacattga caactatatt gtagaagccg 900  
 gactcgccag tttcattctt actatcaaat ttggtattga aaccatgtat cctgcattag 960  
 gccttcacga gttcgccggg gaattgtcca ctattgaatc cttgatgaac ttgtatcaac 1020  
 agctaggaga gggtgcaccc tacatgggtga ttctagagaa ctcaattcag aacaagttta 1080  
 gtgcaggagc ctatcctctc ctctggagct atgcgatggg tgtcggagtc gagttggaga 1140  
 actcaatggg gggcctgaac tttggcagggt catattttga cccggcctat ttccgtctcg 1200  
 gacaggagat ggtcagaaga tctgcaggaa aggtcagctc tgtaatcgcg gctgagcttg 1260  
 gtatcacagc agaggaagcc aaactagtct cggaatcgc ctcacagact ggggatgaac 1320  
 gaaccgttag agggactggg cctcgacagg cgcagggtctc cttcctccag cataaaacag 1380  
 atgagggaga gtcgcctaca cctgcgacca gagaagaagt caaagctgcg atcccaaag 1440  
 ggtccgaagg aagggacaca aagcgaacac gctcaggaaa gccagagga gaaactcccg 1500  
 gccaactgct tccggagatc atgcaagagg atgaactctc gcgagagtct agtcaaaacc 1560  
 ctcgtgaggc tcaaagatcg gctgaggcac tcttcaggct gcaggccatg gccaagattc 1620  
 tggaggacca ggaggaggga gaagacaaca gtcagatcta caacgacaag gatctcctca 1680  
 gctgagcaga cgcaccctcc gtccaaatca gtgacaagac atcgcccgcc agtattataa 1740

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|             |             |            |            |            |            |      |
|-------------|-------------|------------|------------|------------|------------|------|
| aaaacttagg  | acccaggtcc  | aagcaaccac | acatcgacac | cccagccaat | cgagtagaga | 1800 |
| ccaccgatgg  | cagaagaaca  | agcataccat | gtcaacaagg | gactggaatg | tatcaagtct | 1860 |
| ctcaaagcct  | ctcccccgga  | tctatccacc | atcaaagatg | cccttgagag | ctggagagag | 1920 |
| gggcttagcc  | cctcaggccg  | tgcaacaccg | aaccctgata | cgtccgaggg | agaccatcag | 1980 |
| aatatcaacc  | aatcatgctc  | accagcaatc | ggatcagaca | aagtcgacat | gtctcctgaa | 2040 |
| gataatctcg  | gatttagaga  | gatcacttgt | aatgacagtg | aggctgggct | cggaggagtt | 2100 |
| ctggataaag  | gatccaactc  | tcaagtacag | cgttactatg | tttatagcca | cgggggtgaa | 2160 |
| gagattgaag  | gactcgagga  | tgctgactct | ctcgtggttc | aagcaaatcc | tccagttact | 2220 |
| gacaccttca  | atggaggaga  | ggatggatct | gacgacagcg | atgtggactc | tggcccagat | 2280 |
| gatccccgga  | gagatcctct  | atatgaccgg | ggatctgctg | ccggcaatga | tgtctctagg | 2340 |
| tcaacagatg  | tcgaaaaatt  | agaaggtgat | gacattcaag | aagttcttaa | ctcccagaag | 2400 |
| agtaaaggag  | gaagattcca  | aggcgggaaa | atcttgcggg | tcccggaaat | acccgatgtc | 2460 |
| aagaactcta  | gaccatcagc  | ccaatcaatt | aaaaagggca | cagacgggaa | ctcagtctta | 2520 |
| tctggaacgg  | tgacagagtg  | ttcatcgata | agtggtgcaa | cccaagctgt | gccagagtcc | 2580 |
| agatggggagt | catcagagcg  | aaatgctgtc | gtggggagtg | tcccaaatac | tgcgaggagt | 2640 |
| gcaaagacga  | tccagggggt  | gacacaagaa | tctggtacca | tagcatcact | gactcagcct | 2700 |
| aaagagaatg  | actccgagtt  | tgagtatgag | gatgatctat | tcacagagat | gcaggagatt | 2760 |
| cgtgcaagca  | ttgctaagat  | ccatgatgac | aacaaaacta | tcctctcaaa | acttgattct | 2820 |
| ctactgttat  | tgaaaaggaga | aatcgatact | atcaagaaac | aaatcagcaa | acaaaatata | 2880 |
| agtatatcta  | ccattgaggg  | ccatctatcc | agtataatga | tagccatccc | gggctttggg | 2940 |
| aaggacatca  | aggaccaaac  | atctgagggt | gagttgaacc | cggatttgag | acctataatc | 3000 |
| agccgtgatt  | ctggcagggc  | tcttgcgagg | gtcctcaaga | aacccgctgt | tgataggtct | 3060 |
| cagaaaagcg  | gaatcaaagt  | caactccggt | tcaaagggtc | agctccttaa | ggatctccag | 3120 |
| ctaaaacctg  | tcgacaaaca  | ggcaagctct | gcaatcgagt | ttgttccatc | tgaccatgaa | 3180 |
| tcattccagga | gtgtcatccg  | ctccataatc | aagtcgagca | agcttaacat | tgatcacaag | 3240 |
| gactatcttc  | tagatttact  | gaatgatgtg | aaaggctcca | aggatcttaa | ggaattccac | 3300 |
| aagatgctaa  | cagccattct  | tgccaagcag | ccgtaacaca | tcctataatc | aacatctcat | 3360 |
| actcggttga  | aaacatcctc  | tcaatcaggc | tattacaaaa | aacttaggag | caagggcaac | 3420 |
| tgagcttcac  | agacaagatg  | accgagatct | acgattttga | taaatcagca | tgggatgtca | 3480 |
| aagggtcaat  | tgctcgcata  | gaaccaccca | cctatcacga | cggccgactg | atacccatg  | 3540 |
| tgagagtcac  | cgatcctggt  | ctgggagaca | ggaaagatga | gtgcttcatg | tacctgtttc | 3600 |
| ttctaggagt  | gattgaggat  | aacgaccccc | tgtctcccc  | agtcggtaga | accttcgggt | 3660 |
| ctttacctct  | aggggttggt  | agatcaaccg | ccaggccaga | agaactacta | agggaggcca | 3720 |
| cagaactaga  | catagtgggtg | aggcgcacgg | caggactaaa | tgagaaactg | gtattttaca | 3780 |

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|  |      |
|--|------|
| acaacactcc gctgtctttg ttaacacctt ggaggaaagt cttgacaacc ggaagtgtgt  | 3840 |
| ttagcgctaa ccaggtttgc aatgcagtca acctagtccc acttgatact cccagagat   | 3900 |
| tcaggggtgt gtacatgagt ataactagat tgtcagataa tggttattat agtgtcccca  | 3960 |
| gaagaatggt ggagttccgc tcagccaatg cagtcgcctt caatatcttg gttacactga  | 4020 |
| gaattgaaaa tggcacaac cctagcagat acatagtcgg ctcatgggag aatccagagg   | 4080 |
| tcacatttat ggtacacgtg ggcaacttta gaagaaagaa gaacaaggta tactctgctg  | 4140 |
| attattgcaa aatgaagatt gaaaagatgg gtctagtttt tgccttggga ggaatagggtg | 4200 |
| gaacaagtct ccatattcga agcacaggga aaatgagcaa gaccctccat gcacagctgg  | 4260 |
| ggttcaagaa aatcctatgc taccctctaa tggatattaa tgaggatctt aaccgatatc  | 4320 |
| tctggcgggc agagtgccga atagtcaaaa tccaggccgt cttacagcca tcagtacccc  | 4380 |
| aagaattccg tgtctatgat gatgtcatca tcaacgatga tcaaggcctg ttcaagatcc  | 4440 |
| tgtaatcac ctgcagggcc acggacccac cccaggggag aggccttcct ccctcccgtc   | 4500 |
| caaaacacac accccaagggt tccccgaaac agcgccgaca cagccacccc tctggcggaa | 4560 |
| cgaggccgaa ccccccaaca aactcgctcc gggggggggc cccccccacg acccgccggg  | 4620 |
| cgccgaccgc gcgagccggc gagacacccc caagaggccc cgacgaagac cgggcaaccc  | 4680 |
| tccccagaa aaggcccacc aacacacccg aggccaggcg ccgggcaccc ccagccccgc   | 4740 |
| caccggcggg acaggaggac aagacggggt ccccccaacc aaagggacca ccagggaagg  | 4800 |
| ctccgccgac ccagcacaga cccggcccaa acaaagcaga cccccaagac gaaatcgccc  | 4860 |
| agcacacccc attcatcatc aaacaaaact taggggtcaa gtccagacga cagaccccgg  | 4920 |
| tccgccaggc agcaagccgc agaaaggaag gagacaagac cggcccggaa ggaggacacc  | 4980 |
| caaccacaga aacccccaac accaggggag gagcccccc ctccacacgg cggaggaaacg  | 5040 |
| ggcgaggggc accgaggaga acccgatcgg gagccaggag ccggagacgc cagcggtaaa  | 5100 |
| caggccgggc acacatccga caccaccgga ggaccagaga agggcccgac cccgcgtgga  | 5160 |
| cccgacggca ggggatctaa ccccgccaca aagagaggcg agaaccctcc ccccgccaca  | 5220 |
| caaccggcag acagaccgag ggaggaccac ctcccaacca gacaggcggc tctcccgag   | 5280 |
| ccgagccgca ggtcccaaga agaggacacc cccgaaacct cccagaacct ctccgctccc  | 5340 |
| ggccgcccgg acaggagctc cgccgccaaa aaccagagtc accgagagcc aaccaggggt  | 5400 |
| ccccccaat ccctcccggc gccctcccac agaggctcca gcaaagtccc tcggcccgcac  | 5460 |
| gacccatgca tgcgccgaaa gagaaacca ccaaaggacg tccagtacat ccatgtataa   | 5520 |
| acatcatgac acgggtcgca accttagtat ttctgtttct tttcccaaac actgtcacgt  | 5580 |
| gccagattca ctggggcaat ctatccaaga tcgggattgt aggaacaggg agtgccagct  | 5640 |
| acaaggtgat gactaggcca agccaccaa ctctgggcat aaagttgatg ccaaatataa   | 5700 |
| cagccatcga caattgtacg aaatcagaga ttctcagagta caaaagattg ctgatcacag | 5760 |
| tgttaaagcc tgtagaggat gccctgtcag tgataaccaa gaatgtaaga ccaattcaaa  | 5820 |

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|             |             |             |             |             |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ctctaacacc  | tggg'gcag   | acccg'cgtt  | ttgtcggagc  | tgttctggcc  | ggagtagcac  | 5880 |
| ttggagtcgc  | gacagccgct  | caaataactg  | ccggagtcgc  | actccatcag  | tcattgatga  | 5940 |
| attcccaagc  | aattgaaagt  | ttaaaaacca  | gtcttgagaa  | gtcgaatcag  | gcaatagaag  | 6000 |
| aaatcagact  | tgcaaataag  | gagaccatac  | tggcgggtaca | gggcgtccaa  | gactatatca  | 6060 |
| acaatgagct  | tgtcccctct  | gttcatagaa  | tgtcatgtga  | gcttgtaggt  | cacaaactca  | 6120 |
| gtctcaagct  | ccttaggtat  | tataccgaga  | tcctgtctat  | attcgggcct  | agccttcgag  | 6180 |
| acccgatagc  | tgctgaaata  | tcaatccagg  | cactcagcta  | tgcattaggc  | ggagacatca  | 6240 |
| ataaaattct  | ggacaagctt  | gggtatagcg  | gcggggattt  | ccttgctatc  | ctagaaagca  | 6300 |
| aggggataaa  | ggcccgggtc  | acatatgtgg  | acacaagaga  | ttactttata  | attcttagca  | 6360 |
| tagcctaccc  | aaccttatct  | gagatcaagg  | gggtgatagt  | tcataagata  | gaagctatat  | 6420 |
| cctacaatat  | tggggcacag  | gaatggtata  | ctactatccc  | tagatatgta  | gccactcagg  | 6480 |
| gatatctgat  | atcgaatttc  | gatgagacgt  | catgcgtctt  | cactccagag  | gggacagtct  | 6540 |
| gcagccagaa  | tgcgttgtat  | ccaatgagcc  | cattgcttca  | ggaatgcttc  | agggggtcga  | 6600 |
| caaaatcgtg  | cgccagaacc  | ctagtcttcag | ggaccacaag  | taatagattt  | atcctatcaa  | 6660 |
| aagggaaactt | gattgcaaata | tgtgcgtcag  | ttttgtgcaa  | gtgttacaca  | acggagacag  | 6720 |
| ttatcaacca  | agatcctgat  | aaactactaa  | ctgttatagc  | ctccgataag  | tgtcccgtag  | 6780 |
| tcgagggtga  | tggagtgcga  | atacaggctc  | gcagtcgaga  | gtacccagat  | tctgtatacc  | 6840 |
| tacatgaaat  | agacttaggc  | ccagccatct  | ccctggagaa  | actggatgta  | ggcaccaatt  | 6900 |
| taggcaatgc  | agtcacaaga  | ctggagaatg  | caaaggagct  | actagatgca  | tcagaccaga  | 6960 |
| tactgaagac  | tgttaaaggg  | gtacctttca  | gtggcaatat  | atacatagca  | ctggcagctt  | 7020 |
| gcattgggggt | atccctaggg  | cttgtcacat  | taatattgctg | ctgtaagggg  | agatgtagga  | 7080 |
| acaaggagat  | tcctgcctcc  | aaaatcaacc  | cagggtctcaa | acccgaccta  | accgggactt  | 7140 |
| caaagtcgta  | cgtagagatca | ctgtagttag  | aataacccga  | atcatccagc  | atcacacata  | 7200 |
| tacatgtgcg  | acacaagcag  | tcagaggacg  | cagaagattc  | aacttccgat  | caccgaccag  | 7260 |
| acccactctt  | acgcccattt  | acacattggt  | catcaaaca   | aacttaggac  | gaaagggtcaa | 7320 |
| tcaccatgtc  | cgcacaaagg  | gaaaggatca  | atgccttcta  | caaagacaat  | cttcataata  | 7380 |
| agacccatag  | ggtaatcctg  | gatagggaac  | gcttaactat  | tgaaagaccc  | tacatcttac  | 7440 |
| ttggagtcct  | actggtaatg  | tttctgagtc  | taatcgggct  | gctggccatt  | gcagggatca  | 7500 |
| ggcttcaccg  | agccaccggt  | gggactgcgg  | agatccagag  | tcggctgaat  | accaacattg  | 7560 |
| agttgaccga  | atccattgat  | catcaaacta  | aggatgtctt  | aactcccctg  | tttaaaatca  | 7620 |
| ttggtgatga  | agtcggcatc  | agaattccac  | agaagttcag  | tgatcttgtc  | aagttcatct  | 7680 |
| ccgataagat  | taagttcctc  | aaccctgaca  | gagaatatga  | ttttagggat  | ctccgggtggt | 7740 |
| gtatgaaccc  | ccctgagaga  | gtcaaaatta  | actttgacca  | gttttgtgaa  | tacaaagccg  | 7800 |
| cagtcaagtc  | agttgaacat  | atattttgagt | catcactcaa  | cagggtcagaa | aggttgcgat  | 7860 |

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|             |             |             |             |            |             |      |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|------|
| tattgactct  | tgggcccgga  | acaggctgtc  | tcggcaggac  | agtaacaaga | gctcagttct  | 7920 |
| cagagcttac  | gctgaccctg  | atggacctgg  | atctcgagat  | gaagcacaac | gtgtcctcag  | 7980 |
| tgtttaccgt  | agtcgaagag  | ggattattcg  | gaagaacata  | tactgtctgg | agatccgaca  | 8040 |
| ccggaaaacc  | gagcaccagt  | ccagggtattg | gccatttttt  | aagagtcttc | gagatcgggc  | 8100 |
| tggtgagaga  | tctcgagctg  | ggtgccccta  | ttttccatat  | gaccaactac | ctcacagtaa  | 8160 |
| acatgagtga  | tgactatcgg  | agctgtcttt  | tagcagtagg  | ggagttgaag | ctgacagccc  | 8220 |
| tatgcacccc  | atctgagact  | gtgactctga  | gtgagagtgg  | agttccaaag | agagagcctc  | 8280 |
| ttgtggttgt  | gataactcaac | ctagctgggc  | ctactctagg  | gggcgaacta | tacagtgtat  | 8340 |
| tgcctaccac  | tgaccccacg  | gtggagaaac  | tctattttatc | ctcacatagg | gggattatca  | 8400 |
| aagataacga  | ggccaattgg  | gtagtaccgt  | cgaccgatgt  | tcgtgatctt | caaaacaaag  | 8460 |
| gagaatgtct  | ggtggaagca  | tgcaagactc  | gacctccttc  | attttgcaat | ggcacaggaa  | 8520 |
| taggcccattg | gtcagagggg  | agaatccctg  | cctacggggg  | gatcaggggc | agtcttgact  | 8580 |
| tagctagtga  | cccgggtgta  | gttatcactt  | cagtgtttgg  | cccattgata | cctcacctat  | 8640 |
| ccggcatgga  | tctttacaac  | aatccgtttt  | caagagctgc  | atggttggct | gtaccacctt  | 8700 |
| atgagcagtc  | atttctagga  | atgataaata  | caattggctt  | cccggacaga | gcggagggtta | 8760 |
| tgccgcacat  | tttgaccaca  | gagatcagag  | ggccccgagg  | tcgttgtcat | gttcctatag  | 8820 |
| aattgtcccc  | caggattgat  | gatgatatca  | agatcgggtc  | caacatgggt | gtattgccga  | 8880 |
| cgaaggacct  | gagggtacata | acagccactt  | atgatgtttc  | caggagcgag | catgcaatcg  | 8940 |
| tgtactatat  | ctatgacacg  | ggtcgctcat  | catcttactt  | ctaccagtt  | cgattgaatt  | 9000 |
| tcaggggcaa  | tcctctctct  | ctgaggatag  | agtgttttcc  | ctggtatcat | aagggtgtgt  | 9060 |
| gctaccatga  | ttgtcttata  | tacaacacca  | taacaaacga  | agaagtccac | acgagagggc  | 9120 |
| tgaccgggtat | agaggtaaca  | tgtaatccag  | tctgagtaga  | gctgcaacca | tactcagagc  | 9180 |
| aggcctccga  | gccatcccct  | agtccaagca  | gcataccctg  | ggacactcag | cagcacaacc  | 9240 |
| cagccaacaa  | tgttataaaa  | aacttaggag  | ccaaggttgt  | aggagccatg | gactcactat  | 9300 |
| cagtcaatca  | ggtcttgtac  | cctgagggtc  | atctagatag  | ccctattgtc | acaaacaaac  | 9360 |
| tagttgccat  | ccttgaatac  | tcggggatcg  | accacaacta  | tgttcttgaa | gaccagaccc  | 9420 |
| ttatcaagaa  | tattagatat  | agactggggg  | gcgggttttc  | aaatcaaatg | atcatcaata  | 9480 |
| ataggggggt  | agggtgaaaca | gtcaattcca  | aacttaaaag  | ttacccccgt | aattgtcata  | 9540 |
| tcatataccc  | agactgcaat  | aaggatttgt  | tttgatatcaa | agatcgctgc | atatctagga  | 9600 |
| agctctcgga  | gctattcaag  | aagggttaatt | ccttgtactc  | taagataagt | cacaagggtac | 9660 |
| tggattgtct  | taagagagtc  | aacgggaaat  | taggcctggg  | cacagatctt | actcacggcc  | 9720 |
| tgaaggaggg  | tatcctcgac  | ttgggggtgc  | acatgcatag  | ctctcaatgg | ttcgagacct  | 9780 |
| ttctgttctg  | gttcaactatc | aagacagaga  | tgagatcaat  | gatcaaagaa | cagtcccata  | 9840 |
| tatgccacaa  | gaggaggtat  | aacccaattt  | ttgtgtcggg  | ggatgcattc | gagggtgctcg | 9900 |

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|              |            |             |            |             |             |       |
|--------------|------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------|
| tatcacgaga   | cctcgttgtg | ataattgata  | agaacaccca | gtatgtcttc  | tacctgacat  | 9960  |
| ttgagttggt   | ccttatgtat | tgtgatgtca  | tagagggcag | acttatgacg  | gagacagcca  | 10020 |
| tggctataga   | ccagagatat | tcagagctcc  | taaaccgggt | cagatacttg  | tgggatctta  | 10080 |
| ttgatggggt   | cttccaaca  | ctgggtaaca  | ccacatacca | agttgttgct  | ctgcttgaac  | 10140 |
| cactgtcgtt   | ggcttatctt | caacttcagg  | atgtcactct | agagttaaga  | ggtgcttttt  | 10200 |
| tggaccactg   | cttcaaagaa | ctttatgaga  | tactggagca | ttgtggcatt  | gacacggaag  | 10260 |
| gtacctacaa   | ttccatcact | gaaggattgg  | attacgtatt | tatcacccac  | gatatacact  | 10320 |
| taactgggga   | gattttttca | ttttttcgga  | gtttcggaca | ccccgcctc   | gaagcgggtca | 10380 |
| ccgctgcaga   | gaatgtcaga | aaacatatga  | accaaccgaa | ggtaatcagt  | tatgagacta  | 10440 |
| tgatgaaagg   | gcatgcagta | ttttgcggga  | taatcataaa | tggttttagg  | gaccggcacg  | 10500 |
| gcggcagctg   | gccccctgtt | gcattgccag  | aacatgcttc | tgctgcgatc  | cggaatgcgc  | 10560 |
| aggcatccgg   | tgaaggactg | acccatgacc  | tgtgtataga | caactggaag  | tcctttgttg  | 10620 |
| gattcagatt   | tggctgcttc | atgccgctca  | gcctagatag | tgatttgacc  | atgtacctca  | 10680 |
| aagacaaaagc  | actggctgca | ctgaagaatg  | agtgggattc | agtttaccg   | aaagaatacc  | 10740 |
| tccgttataa   | tccacctaga | gggacagagt  | caaggcgact | ggtagagggtg | ttcctgaatg  | 10800 |
| actccagctt   | tgatccttat | aacatgataa  | tgtacgtggt | gaatggctcc  | taccttaaag  | 10860 |
| accctgagtt   | taatctctca | tacagcctaa  | aggagaaaga | gataaaaagag | acagggcgat  | 10920 |
| tgtttgccaa   | aatgacctac | aagatgcggg  | cctgtcaggt | aattgctgaa  | aatctgatat  | 10980 |
| caaatggtgt   | tgggaagtat | ttccgagaca  | atgggatggc | aaaagacgag  | catgacctaa  | 11040 |
| caaaagccct   | tcacactcta | gcagtctcag  | gtgttcctaa | gaataacaaa  | gataaccacc  | 11100 |
| gagggtgggccc | tcccagaagg | accacaagcc  | gagagatgag | atcaagccaa  | gacatcaaca  | 11160 |
| cacaaaaatag  | agacaagatc | caagggggccc | ctatgtacaa | ctacttgcca  | tgccaaccga  | 11220 |
| ccggccctga   | tcagggtgag | tcatacgaga  | ctgttagtgc | attcatcact  | gctgacctta  | 11280 |
| agaagtattg   | cctaaattgg | agatacgaga  | caatcagcat | atttgcacag  | agactgaatg  | 11340 |
| aaatatatgg   | gttgccatcc | ttctttcaat  | ggttacacag | ggtattggaa  | aaatccgtgc  | 11400 |
| tctacgtcag   | tgatccgcat | tgccctcccg  | acttagatga | tcatatccct  | ctggacagtg  | 11460 |
| tccctaattgc  | ccaaatattc | atcaagtacc  | caatgggcgg | agtagaagggt | tattgtcaaa  | 11520 |
| aactatggac   | aatcagtact | ataccttact  | cgtatctggc | agcctatgag  | agcggagtaa  | 11580 |
| gaatcgccctc  | actagtgcaa | ggtgacaatc  | agacaattgc | agtgacaaaa  | agagttccaa  | 11640 |
| gttcttgccc   | ttattcacta | aaaaagaggg  | aggcatccaa | agcagctcaa  | aattacttcg  | 11700 |
| tggtcctaag   | gcaaagggtg | cacgatgtag  | gtcatcactt | aaaggcta    | gagaccatag  | 11760 |
| tatcttctca   | cttttttgta | tactctaaag  | ggatttatta | tgacggcctg  | ttagtctcac  | 11820 |
| aatcactaaa   | gagcatcgcc | agatgtgtct  | tctggtccga | gactattgtg  | gatgaaacca  | 11880 |
| gagcggcctg   | cagcaatatt | gcaacaacta  | tcgccaagag | tatagagagg  | ggttatgata  | 11940 |

## F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|             |             |             |             |            |             |       |
|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------|
| ggtacctcgc  | atactctttg  | aatatcctca  | aaattttcca  | acagatcctt | atatctcttg  | 12000 |
| acttcacgat  | taacacaaca  | atgactcaag  | atgtcgtggc  | accgatcatc | gagaacgggtg | 12060 |
| atttactaat  | aaggatggca  | ctcttgccag  | cacccattgg  | gggtctcaat | tatcttaaca  | 12120 |
| tgagcagggt  | atgtgtgaga  | aatatcgggtg | acccgggtcac | ttcctccata | gccgacctga  | 12180 |
| agaggatgat  | agccgctggg  | ctaattgccag | aagaaacatt  | gcatcaagtg | atgacccaga  | 12240 |
| ccccgggaga  | atcatcctac  | ctcgattggg  | caagtgaccc  | ttattctgcc | aacctaacct  | 12300 |
| gcgtacagag  | tataactcgc  | cttctcaaga  | acatcactgc  | acggtatatt | ttaatcagca  | 12360 |
| gccccaaatcc | gatgctgaaa  | ggattgtttc  | atgagggggag | tagagatgaa | gacgaagagc  | 12420 |
| ttgctgagttt | cttgatggat  | cggcatataa  | ttgttccgag  | agctgcacat | gaaatcttag  | 12480 |
| accatagcat  | aaccggagca  | agagaagcta  | tagccgggat  | gttgacaccc | accaagggtc  | 12540 |
| tgattagaac  | aagtatgaag  | cgggggtggc  | tcacccctcg  | agtattagcc | cgcctttcca  | 12600 |
| attatgatta  | tgaacaattc  | agatccggaa  | taacattatt  | gacaaagaaa | gggcagtgtt  | 12660 |
| atctcattga  | caaggactcg  | tgctcgggtg  | agctcgctat  | agccctgagg | gaccacatgt  | 12720 |
| gggccagggt  | agctcgcggg  | agacctatct  | atgggttggg  | ggtgcctgat | atactggaat  | 12780 |
| cgatgaacgg  | ctaccttatc  | aaacgccatg  | agtcctgtgc  | catctgtgaa | acgggctcaa  | 12840 |
| gtcactacgg  | gtgggtttttc | gtccctgcag  | ggtgccagct  | tgacgatgtc | tcaagagaga  | 12900 |
| cttcggctct  | tcgtgtacct  | tatgtcggat  | caaccactga  | ggaaaggaca | gatatgaaac  | 12960 |
| ttgctttcgt  | tagatctcca  | agccgagccc  | tcaaatcagc  | agtcagaatt | gccacagttt  | 13020 |
| actcatgggc  | ctacggggat  | gatgagaaat  | catggagtga  | agcttgatg  | ctagctaggc  | 13080 |
| agagagctga  | tatcacctta  | gatgaattga  | gaatgatcac  | tccagtctct | acatccacca  | 13140 |
| acctagccca  | tcggttgagg  | gatcggagca  | cccagggtgaa | atattcgggg | acatcccttg  | 13200 |
| tgaggggtgc  | aggatacaca  | accatctcca  | atgacaattt  | gtcatttgtg | atatctgaga  | 13260 |
| aaaaagtaga  | taccaacttc  | atttaccagc  | aagggtgct   | gctcgggtct | gggatccttg  | 13320 |
| agaatctctt  | cagattagag  | gccaccacag  | gggtatccaa  | cacagtgtca | cacctacacg  | 13380 |
| tggaacacaga | atgttgtgtt  | gtacccatgg  | ttgatcacc   | aaggataccg | agtctccgta  | 13440 |
| atattaaagt  | tacgaatgag  | ctatgcacaa  | accctctgat  | ctacgacagg | tcccccatca  | 13500 |
| tagaacacga  | tgcaactcga  | ttatactcac  | aaagccacag  | gagacatttg | gtggagtttg  | 13560 |
| ttacctggtc  | aacaagccag  | ctttatcata  | tactggccaa  | atctacagca | atgtccatga  | 13620 |
| ttgagttgat  | cacaagattt  | gagaaagatc  | acatgaatga  | aatagccgcc | ctgattggcg  | 13680 |
| atgacgacat  | caacagtttc  | atcacagaat  | ttttgctagt  | agagcccaga | ttgtttatag  | 13740 |
| tttaccttgg  | ccagtgtgct  | gccatcaatt  | gggcttttga  | tatacattat | catcggccct  | 13800 |
| cggggaagta  | ccagatgggg  | gaactcctct  | actccttact  | ctctcggatg | agcaaaggag  | 13860 |
| tatataagat  | cttcactaat  | gctctgagtc  | accctaaagt  | ttacaagaaa | ttttggcgaa  | 13920 |
| gtgatgtaat  | tgagccgact  | catggcccat  | ccctagatac  | acagaattta | catgtcactg  | 13980 |

F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

|                       |                                 |                        |       |
|-----------------------|---------------------------------|------------------------|-------|
| tctgtgacat gatatacggg | tcatacgtca cctatctgga tcttttctg | aatgatgagc             | 14040 |
| tagatgatta cccgtatttg | ctctgcgaga gtgatgagga           | cgtgggcaca gacagggtcg  | 14100 |
| acaacattca agccaaacat | ctctgtgtac tggccgatgt           | ctactgcagc tccaagagat  | 14160 |
| gtccctcgat catcgggatg | tctcctatag aaaaatgcac           | catcctcaca cattacatca  | 14220 |
| agggagaatc ggtacaatcc | ccgtccggga tctcatggaa           | cactgatccc cttgtagtag  | 14280 |
| atcattactc atgctctctg | acctaccttc gccgcgggttc          | catcaaacaa atcagggttga | 14340 |
| gagtggatcc tgggttttga | ttcgaggcgt tgacagacat           | cgacttcaaa cagcctcgca  | 14400 |
| aggctaagtt ggatgtatcg | gttgtgggggt tgactgattt          | ttctccccct tgggataacg  | 14460 |
| tcggtgattt tctagggact | atcaacacat tgaggcaca            | tctgcccgtc accggaaccg  | 14520 |
| gggtctcgaa ctatgaagtc | caggcttattc gtagaatcgg          | cctgaattca tcagcatgtt  | 14580 |
| ataaagctgt agagatctcc | acgttaatca agtcatcttt           | agaagtcgga gagaatgggt  | 14640 |
| tgttcttagg agaaggttcc | ggttctatgc tggctgcgta           | caaggaagtt cttaaattgg  | 14700 |
| caaactgtta ttacaacagc | ggggtaacag cggagggcag           | agccggacag agggaaatct  | 14760 |
| ctccctatcc ctgagagatg | agcctagtag agaatcagat           | ggggatagag aggagtgtta  | 14820 |
| aagtgtgtt caatggcaaa  | cctgaagtaa cctgggtagg           | gaccaccgat tgctacaagt  | 14880 |
| atataatcag taacattcag | acctctagtc tgggtttcat           | acactcggat attgagacac  | 14940 |
| tcccaaccaa ggatgccgtt | gagaagttag aagaatttgc           | ctctatccta tccctatccc  | 15000 |
| taattttggg aaaaatcggc | tctattacag ttgtcaaaat           | tatgcccatt agcggagatt  | 15060 |
| ttacccaagg cttcatagcc | tatgccattc aatattttag           | agagagcctg cttgcctacc  | 15120 |
| cgagatatag taacttcac  | tcgactgagt gttaccttat           | tatgatagga ttaaaggcca  | 15180 |
| atcggttgat aaaccagaa  | gccattaagc aaagcataat           | cagagtgggg actaggactg  | 15240 |
| caccaggact tgtgagccac | atattatcag agaaacagaa           | aggttgtatt caatcttttc  | 15300 |
| tgggtgatcc ttatatccaa | ggagacttca ataagcacct           | taaagctcta acccctattg  | 15360 |
| agaaaatcct agtaaattgt | ggtctctcga tcaatggcac           | aaaaatctgt agggatctaa  | 15420 |
| tccaccatga tatcgcttcc | ggtccagacg gtctgatgag           | ctccacaatt attttgtata  | 15480 |
| gggaactggc ccatattcaa | gacaatataa gaagtcagca           | cggtatgttc caccctatc   | 15540 |
| cagtattggc cagtagcagg | caacgtgaat taatccttcg           | aatagccaag aaattctggg  | 15600 |
| ggtatgtctt gctatattca | gatgacccgg cactaatcaa           | acaaacgatc aagaacttga  | 15660 |
| agcggaatca cctaaccctt | gacttacaca gtaatccgtt           | tattaagggc ttatccaaag  | 15720 |
| ctgagaaact gctagtgcgg | acaagttcac tcagaaggga           | atggttggtc actctcaata  | 15780 |
| cgaaagaagt gaaagagtgg | ttcaaattgg tgggttacag           | tgactcgtc agagggtta    | 15840 |
| tcgcgatacc tctgccccct | tctcctccgc catgagactc           | tactggcaat ctaaaagatt  | 15900 |
| aaagaaaact acatattgga | taagtatcta ttcccagctt           | tgtctgggt              | 15948 |



F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> peptide synthétique Flag

<400> 6

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys  
 1 5

<210> 7  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> peptide morbillivirus chimère synthétique

<400> 7

Asp Pro Asp Asp Asp Arg Lys Ser Ala Glu Ala Leu  
 1 5 10

<210> 8  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> virus de la maladie de Carré (CDV)

<400> 8

Gly Asn Asp Asp Asp Arg Lys Ser Met Glu Ala Ile  
 1 5 10

<210> 9  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> morbillivirus affectant les phoques (PDV)

<400> 9

Asp His Asp Asn Asp Gln Gln Ser Met Asp Gly Leu  
 1 5 10

<210> 10  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> amorce beta-act1

<400> 10  
 accaactggg acgacatgga ga

22

<210> 11  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> artificial sequence

<220>  
 <223> amorce beta-act2

## F1367-25-séquences\_ST25 (2).txt

<400> 11  
agctggtcct gctcgaagtc 20

<210> 12  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> amorce eGFP-C1 F

<400> 12  
ctggtcgagc tggacggcga cg 22

<210> 13  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> artificial sequence

<220>  
<223> amorce eGFP-C1 R

<400> 13  
cacgaactcc agcaggacca tg 22

<210> 14  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Virus de la peste des petits ruminants

<400> 14  
Asn Pro Arg Glu Ala Gln Arg Ser Ala Glu Ala Leu  
1 5 10

<210> 15  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Virus de la peste des petits ruminants

<400> 15  
Thr Ser Arg Glu Ala Gln Arg Ser Ala Glu Ala Leu  
1 5 10

<210> 16  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Virus de la peste des petits ruminants

<400> 16  
Thr Pro Arg Glu Ala Gln Arg Ser Ala Glu Ala Leu  
1 5 10

# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

# 1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION

QIANQIAN HU ET AL: "Rescue of recombinant peste des petits ruminants virus: creation of a GFP-expressing virus and application in rapid virus neutralization test", VETERINARY RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD, LONDON, UK, vol. 43, no. 1, 2 juin 2012 (2012-06-02), page 48, XP021132291, ISSN: 1297-9716, DOI: 10.1186/1297-9716-43-48

CN 102 071 218 A (HARBIN VET RES INST CAAS)  
25 mai 2011 (2011-05-25)

S. PARIDA ET AL: "Rescue of a chimeric rinderpest virus with the nucleocapsid protein derived from peste-des-petits-ruminants virus: use as a marker vaccine", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 88, no. 7, juillet 2007 (2007-07), pages 2019-2027, XP055061792, ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.82913-0

CAROLINE MLANIE ADOMBI ET AL: "Monkey CV1 cell line expressing the sheepgoat SLAM protein: A highly sensitive cell line for the isolation of peste des petits ruminants virus from pathological specimens", JOURNAL OF VIROLOGICAL METHODS, ELSEVIER BV, NL, vol. 173, no. 2, 23 février 2011 (2011-02-23), pages 306-313, XP028282669, ISSN: 0166-0934, DOI: 10.1016/J.JVIROMET.2011.02.024 [extrait le 2011-03-01]

# 2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL

EP 1 939 214 A1 (PASTEUR INSTITUT [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR])  
2 juillet 2008 (2008-07-02)

PARIDA S ET AL: "Importance of the extracellular and cytoplasmic/transmembrane domains of the haemagglutinin protein of rinderpest virus for recovery of viable virus from cDNA copies", VIRUS RESEARCH, AMSTERDAM, NL, vol. 117, no. 2, mai 2006 (2006-05), pages 273-282, XP024957068, ISSN: 0168-1702, DOI: 10.1016/J.VIRUSRES.2005.10.022 [extrait le 2006-05-01]

K.-S. CHOI ET AL: "Antigenic and Immunogenic Investigation of B-Cell Epitopes in the Nucleocapsid Protein of Peste des Petits Ruminants Virus", CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, vol. 12, no. 1, janvier 2005 (2005-01), pages 114-121, XP055061793, ISSN: 1556-6811, DOI: 10.1128/CDLI.12.1.114-121.2005

US 2006/127952 A1 (CHOI KANG-SEUK [KR] ET AL)  
15 juin 2006 (2006-06-15)

HUBERT BUCZKOWSKI ET AL: "A novel approach to generating morbillivirus vaccines: Negatively marking the rinderpest vaccine", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 30, no. 11, 9 janvier 2012 (2012-01-09), pages 1927-1935, XP028460405, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2012.01.029 [extrait le 2012-01-13]

N° d'enregistrement national : 1257980

N° de publication : 2994697

|   |
|---|
| <b>3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND<br/>DE LA VALIDITE DES PRIORITES</b> |
| NEANT   |